

NEYLANE NYERIA COELHO BATISTA GADELHA



**IMPACTO DO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NO CÉREBRO
FETAL DEVIDO A PERITONITE AUTÓGENA FECAL EM RATAS
WISTAR: Estudo histomorfométrico**

**RECIFE/PE
2016**



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia**

NEYLANE NYERIA COELHO BATISTA GADELHA

**IMPACTO DO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NO CÉREBRO
FETAL DEVIDO A PERITONITE AUTÓGENA FECAL EM RATAS
WISTAR: Estudo histomorfométrico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Linha de pesquisa:
Infecção em Cirurgia

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 N°1010

T249c Gadelha, Neylane Nyeria Coelho Batista.
Impactos do tratamento antimicrobiano no cérebro fetal devido a
peritonite autógena fecal em ratas. – Recife: O autor, 2006.
78 f.: il.; tab.; 30 cm.
Orientador: Carlos Teixeira Brandt
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2016.
Inclui referências e anexos.
1. Peritonite. 2. Dano cerebral. 3. Anacardiaceae. 4. Quilonas. 5. Ratos.
Brandt, Carlos Teixeira. (Orientador). II. Título.
617.92 CDD (23.ed) UFPE (CCS2016-067)

**"IMPACTOS DO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NO CERÉBRO FETAL
DEVIDO A PERITONITE AUTÓGENA FECAL EM RATAS".**

NEYLANE NYERIA COELHO BATISTA GADELHA

APROVADA EM: 24/02/2016

ORIENTADOR INTERNO: CARLOS TEIXEIRA BRANDT

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. Dr. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO (PRESIDENTE) - CCS/UFPE

PROF. Dr. JOSEMBERG MARINS CAMPOS - CCS/UFPE

PROFa. Dra. JULIANA GARCIA CARNEIRO - UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA



REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Dr. Frederico Jorge Ribeiro

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. Josemberg Marins Campos

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Euclides Dias Martins Filho

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. Flávio Kreimer

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Lilian Ferreira Muniz

Prof. Lucio Vilar Rabelo Filho

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

*Dedico esta dissertação aos meus pais, **Norberto e Luzia**, meus amores, que desde cedo me ensinaram com lições e exemplos a importância da educação.*

Sou fruto dos seus valores, dedicação e amor. Tenho certeza de que a sensação de dever cumprido está muito mais presente em vocês do que em mim.

*Aos meus irmãos, **Norberio e Nayane**, por terem sempre compreendido os momentos de ausência e incentivado a concretização dos meus sonhos.*

*A **Diego**, meu marido, pessoa com quem amo partilhar a vida e que me presenteou com meus dois filhos: **Dudu e Laura (ainda no ventre)**.*

Vocês são minha inspiração e fazem a vida valer cada vez mais a pena.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt,

meu orientador e incentivador incansável deste projeto. Sua paixão pela produção do conhecimento novo, a característica solidariedade para ensinar o conhecimento já estabelecido, além da amizade e carinho com que trata a todos o faz ser inesquecível para quem tem a honra da sua convivência.

Ao Núcleo de Investigação experimental da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande, nominalmente à **Tharcia Kiara,** médica veterinária e responsável, pelo suporte técnico no biotério.

À Direção da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande, nominalmente aos **Professores Dalton e Gisele Gadelha,**

por acreditarem que fazer pesquisa de qualidade em uma instituição privada é possível.

À Tia Nena,

*por ter me dado a tranquilidade necessária ao cuidar com tanto carinho de **Dudu,** durante as inúmeras viagens para as aulas do mestrado em Recife.*

Aos amigos e colegas do mestrado,

por terem tornado mais agradáveis os momentos em sala de aula.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estatística descritiva dos pesos dos encéfalos dos três grupos estudados.	25
Tabela 2	Estatística analítica do peso dos encéfalos dos três grupos estudados.	26
Tabela 3	Contagem celular das imagens obtidas nos três grupos.	28
Tabela 4	Comparações múltiplas da contagem celular das imagens obtidas entre os três grupos.	28
Tabela 5	Estatística descritiva do parâmetro tamanho celular nos grupos estudados.	29
Tabela 6	Comparações múltiplas do tamanho celular entre os três grupos.	30
Tabela 7	Comparações múltiplas entre os grupos estudados para área estudada.	31

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição dos pesos dos encéfalos nos três grupos.	26
Figura 2	Etapas de processamento da imagem no <i>software ImageJ</i> a) Imagem histopatológica inicial com coloração em hematoxilina e eosina. b) Imagem em padrão 8-bit com diminuição de partículas menores. c) Imagem binária (preto/branco) finalizada para realização da contagem celular.	27
Figura 3	Processamento final da imagem com contagem de seus núcleos celulares.	27
Figura 4	<i>Box-plot</i> da distribuição da contagem celular pelos grupos.	29
Figura 5	Distribuição do tamanho celular nos três grupos.	30
Figura 6	Distribuição das áreas das imagens analisadas entre os três grupos.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	sistema nervoso central
CEUA/CESED	Comitê de Ética em Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EPM	erro padrão da média
FCM-CG	Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande
GSH	glutathiona
LPS	lipopolissacarídeos
LPV	leucomalácea periventricular
NIH	Instituto Nacional de Saúde
Th2	<i>t-helper</i>
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Apresentação do problema	13
1.2 Justificativa da investigação	14
1.3 Definição dos objetivos	14
1.3.1 <i>Objetivo geral</i>	14
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	15
2 LITERATURA	16
2.1 Septicemia	16
2.2 Infecção no período gestacional	17
2.3 Infecção no período gestacional e dano cerebral	17
2.4 Infecção no período de organogênese humana	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Local de estudo	20
3.2 Tipo de estudo	20
3.3 Seleção	20
3.3.1 <i>Critérios de inclusão</i>	20
3.3.2 <i>Critérios de exclusão</i>	20
3.4 Procedimentos	21
3.4.1 <i>Procedimentos técnicos</i>	21
3.4.2 <i>Análise dos grupos</i>	22
3.4.3 <i>Procedimentos analíticos</i>	24
3.4.4 <i>Procedimentos éticos</i>	24
4 RESULTADOS	25
5 DISCUSSÃO	32
5.1 Escolha do tema	32
5.2 Escolha da ferramenta de investigação histomorfométrica	34
5.3 Resultados	35
5.4 Fragilidades do trabalho	35
5.5 Considerações finais	36

REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE	44
APÊNDICE A – Artigo 1 enviado para publicação	44
ANEXOS	64
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética com uso de animais	64
ANEXO B – Artigo 2 – Publicado	65
ANEXO C – Artigo 3 – Publicação complementar	72

RESUMO

Objetivo: Investigar a densidade neuronal do cérebro de ratos recém-nascidos cujas mães foram submetidas a peritonite autógena fecal e comparar com aqueles cuja mãe recebeu tratamento antimicrobiano agressivo. Métodos: Duas ratas prenhas se submeteram a peritonite com suspensão a 10% de fezes, na dose de 4 ml por quilograma, tendo uma recebido tratamento antimicrobiano venoso constituído por injeção de moxifloxacino na dose de 15 mg/kg e dexametasona na dose de 2,5 mg/kg (contidos em colírio de cloridrato de moxifloxacino a 0,5% e fosfato de dexametasona a 0,1%, além de dois mililitros de extrato alcoólico/aquoso da entrecasca de *Schinus terebinthifolius raddi* que foi injetada na cavidade abdominal. Ambos agentes antimicrobianos foram feitos 24 h após a indução da peritonite. Uma rata preta não foi submetida a peritonite, nem intervenções, sendo caracterizada como grupo controle. Resultados: Os cérebros dos ratos recém-nascidos cujas mães receberam 4 ml/kg da suspensão de fezes a 10% evidenciaram menor tamanho e consistência mais amolecida do que aqueles das mães que tinham recebido tratamento antimicrobiano e os normais do grupo controle. A densidade neuronal do cérebro dos conceptos de mães não tratadas foi significativamente diminuída quando comparada com os grupos tratada e controle $p < 0,01$. Conclusão: Peritonite não tratada em ratas prenhas pode produzir dano cerebral nos conceptos. Tratamento efetivo precoce pode prevenir a diminuição da densidade neuronal do cérebro. A translação para humanos é que a infecção intra-abdominal em mulheres grávidas pode estar associada a dano cerebral nos conceptos. Isto pode ser prevenido usando abordagem terapêutica precoce e adequada.

Descritores: Peritonite; Dano cerebral; *Anacardiaceae*; Quinolonas; Ratos

ABSTRACT

Purpose: To investigate the neuronal density of newborn rat brain whose mothers were subjected to autogenously fecal peritonitis and compare with those whose mothers received aggressive antimicrobial treatment. Methods: Two pregnant rats underwent peritonitis with a 10% suspension of feces at a dose of 4 ml per kilogram. One of them received intravenous antimicrobial treatment consisting of a combination of moxifloxacin at a doses of 15 mg/kg and dexamethasone at a doses of 2.5 mg/kg as an eye drop solution (moxifloxacin cloridrat 0,5% and dexamethasone phosphate 0.1%), in addition of two milliliters of alcohol/aqueous extract of the inner bark of *Schinus terebinthifolius raddi* which was injected into the abdominal cavity. Both antimicrobial agents were injected 24 h after the induction of peritonitis. One pregnant rat didn't receive peritonitis or treatment. It was reported as control group. Results: The brains of newborn rats whose mothers were given 4 ml / kg of 10% fecal suspension evidenced smaller and softer consistency than those from mothers that had received antimicrobial therapy and normal control group. The neuronal density in the brains of untreated fetuses mothers was significantly reduced when compared with the control and treated groups $p < 0.01$. Conclusion: Peritonitis untreated in pregnant rats can produce brain damage. Early effective treatment can prevent the decrease of neuronal densities in the brain. The translation to human is the intra-abdominal infection in pregnant women may be associated with brain damage in her concepts. This can be prevented by using early and appropriate therapeutic approach.

Keywords: Peritonitis; Brain damage; *Anacardiaceae*; Quinolones; Rats



Introdução

1.1 Apresentação do problema

Sepse e choque séptico são problemas clínicos sérios, e apesar do intenso esforço para melhorar a sobrevivência, eles continuam sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes internados em unidades de terapia intensiva no mundo. Não existe tratamento específico, assim o tratamento dos pacientes baseia-se principalmente no reconhecimento precoce, permitindo medidas terapêuticas corretas, com início rápido, incluindo administração de antibióticos adequados, medidas de controle de origem, quando necessário, e reanimação com fluidos intravenosos e drogas vasoativas¹⁻⁴.

A septicemia desencadeia um processo complexo de reações inflamatórias locais e sistêmicas. Citocinas, proteases, mediadores lipídicos, substâncias gasosas, peptídeos vasoativos e marcadores de estresse desempenham papéis importantes na fisiopatologia dessa grave doença. Moléculas de adesão e quimiotaxinas sequestram e ativam neutrófilos para os órgãos alvos, aumentando o processo inflamatório, podendo produzir dano tissular^{5,6}.

A relação de endotoxemia e lipopolissacarídeos (LPS) circulantes em ratas prenhas pode estar associada a alterações morfofuncionais no encéfalo do concepto e tem sido documentada nas últimas três décadas⁷⁻¹⁴. Todavia, os dados de que o estresse infeccioso em um período crítico da gravidez em ratas pode afetar a resposta neuroimune dos filhos é de comprovação recente¹⁵.

A resposta inflamatória sistêmica mediada por quimiotaxinas intraútero tem sido implicada no desencadeamento de complicações no desenvolvimento do sistema

nervoso central (SNC) no período perinatal, como dano cerebral, leucomalácia periventricular (LPV) e paralisia cerebral¹⁶⁻¹⁸.

Em seres humanos, apendicite aguda supurada em mulheres grávidas pode estar associada à microcefalia em recém-nascidos¹⁹.

Para a indução de septicemia em animais é preciso que haja uma porta de entrada para infecção bacteriana com maior possibilidade de que a infecção gere uma resposta inflamatória sistêmica. Este objetivo é preferencialmente atingido a partir de inoculação de suspensão fecal em cavidade peritoneal, introdução de Lipopolissacarídeos, ou inoculação direta de diversos micro-organismos selecionados como *E. coli* e *B. fragilis*^{20,21}.

1.2 Justificativa da investigação

Ainda não foram sistematicamente avaliados os efeitos histomorfométricos no Sistema Nervoso Central (SNC) de conceptos de ratas submetidas à septicemia por peritonite autógena durante o período de organogênese gestacional. Assim, relação causal de infecção sistêmica a partir de peritonite resultando em malformações congênicas no SNC requer investigação mais aprofundada.

1.3 Definição de objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar alterações histomorfométricas no SNC de recém-nascidos de ratas Wistar submetidas à peritonite fecal autógena no período gestacional e comparar essas alterações com o grupo estudo cujas mães prenhas receberam esquema antimicrobiano e um grupo controle.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar morfológicamente o cérebro de recém-nascidos de rata prena com peritonite fecal autógena, comparando-os com conceptos de rata não-infectada e aqueles cuja mãe recebeu intervenção terapêutica com moxifloxacino e dexametasona por via venosa associado a administração de extrato de aroeira por via intraperitoneal;
2. Avaliar os pesos dos encéfalos dos recém-nascidos de ratas dos grupos a serem estudados;
3. Avaliar o possível aparecimento de malformações congênitas;
4. Realizar exame histomorfométrico do cérebro desses animais comparando com os resultados de um grupo controle.



2 Literatura

2.1 Septicemia

O Colégio Americano de Cirurgiões define como septicemia a presença de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), na presença de uma fonte de infecção, documentada com cultura positiva de sangue ou presença de foco purulento que se imagina que seja o fator causal²². A septicemia grave pode ser definida quando a doença se associa a disfunção de um órgão, hipoperfusão, ou hipotensão induzida pela septicemia²³.

A Conferência Internacional de Sepsis modificou o modelo de SIRS e desenvolveu uma visão expandida após revisão da literatura. Esta conferência desenvolveu o conceito de um sistema de estadiamento para sepsis baseado em quatro características distintas designadas pela sigla PIRO, no qual P significa predisposição, indicando co-morbidades que poderiam reduzir a sobrevivência. I representa o insulto ou infecção, o que reflete o conhecimento clínico de que alguns organismos patogênicos são mais letais do que outros. R representa a resposta ao desafio infeccioso, incluindo o desenvolvimento da SIRS. A última letra, O, representa disfunção orgânica e inclui falência de órgãos, bem como a falha de um sistema, como o da coagulação²⁴.

Quando a septicemia é complicada, por falência de órgão, é grave e se constitui em péssimo indicador prognóstico. Isto é particularmente verdade quando a infecção grave se associa ao choque séptico²⁵.

A incidência de sepsis grave e choque séptico vêm aumentando assustadoramente, em parte como resultado do crescente número de indivíduos imunocomprometidos devido a intervenções médicas, como transplantes de órgãos

ou quimioterapia para o câncer, ou simplesmente porque a sobrevivência da população com sistema imunológico debilitado vem aumentando^{26,27}.

2.2 Infecção no período gestacional

Infecção pré-natal é um momento estressante, levando ao aumento de susceptibilidade para doenças mentais em humanos. Gravidez, por si só, representa uma condição imune única que não pode ser atribuída apenas à imunossupressão generalizada. Uma variedade de mecanismos têm sido descritos, que vão desde o não-auto reconhecimento, imunomodulação de populações de células inflamatórias específicas e uma mudança no linfócito *t-helper* (Th2) dirigida à resposta imune, que são mediadas tanto por mediadores localizados quanto sistêmicos. Além disso, uma resposta inflamatória dirigida para o conceito não é considerada uma resposta prejudicial obrigatória; em vez disso, é considerado um fator importante que é necessário para o crescimento normal e desenvolvimento²⁸.

Há evidências de que a inflamação intra-uterina, como a corioamnionite, em diferentes modelos animais pode afetar histologicamente e fisiologicamente o sistema nervoso central (SNC), particularmente, micróglia, astrócitos, interrupção de desenvolvimento axonal e apoptose²⁹⁻³². Em ratos, o estresse oxidativo e escassez de glutathione (GSH) ocorreram em cérebro fetal após contato com lipopolissacarídeos (LPS) das progenitoras e que estas respostas poderiam estar envolvidas no déficit de neurodesenvolvimento³³.

2.3 Infecção no período gestacional e dano cerebral

Insulto infeccioso acometendo a mãe durante a gestação pode influenciar diretamente o desenvolvimento fetal e afetar negativamente o curso normal do desenvolvimento cerebral do recém-nascido. A infecção produz um forte estresse na mãe e no feto. Essa importante experiência adversa tem sido repetitivamente associada à ocorrência de distúrbios mentais e comportamentais^{34,35}. Particularmente, no âmbito de efeitos de infecções bacterianas, a injeção pré-natal de LPS induz o desaparecimento de comportamento inibitório, aumento de ansiedade e diminuição de interações sociais em ratos³⁵.

As citocinas pró-inflamatórias podem causar danos diretos aos oligodendrócitos e neurônios; e secundariamente, danos devido a ativação de células

microgliais na substância branca que são normalmente presentes durante o desenvolvimento e crescimento. Uma vez ativada, micróglia pode secretar citocinas pró-inflamatórias e radicais livres, resultando em lesão celular. A combinação do dano direto e dano secundário por ativação microglial pode aumentar o processo lesivo e fazer com que essa ativação persista por um período mais prolongado, resultando em neuroinflamação, como é percebido em pacientes com autismo e leucomalácea periventricular³⁶.

A ativação de células microgliais pode induzir dano celular por (1) produção de citocinas inflamatórias, das quais muitas têm efeito citotóxico³⁷; (2) produção de metabólitos tóxicos como glutamato e ácido quinolínico, que podem causar danos aos oligodendrócitos³⁸, e (3) liberando produtos oxidativos e radicais livres³⁹.

A produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), tem sido implicada na diminuição do número de progenitores de oligodendrócitos, causando apoptose de oligodendrócitos. Além disso, a combinação de efeitos de TNF- α e interferon- γ reduzem drasticamente a sobrevivência e inibem a diferenciação de progenitores de oligodendrócitos em culturas primárias preparadas de ratos neonatos⁴⁰.

2.4 Infecção no período de organogênese humana

Existe evidência crescente, com diferentes graus de certeza, que sugere a associação de infecções crônicas materna com a resposta imune do recém-nascido, aumentando a susceptibilidade, não apenas ao agente microbiano infectante materno, assim como a outros patógenos⁴¹. Adicionalmente, processos inflamatórios que ocorrem durante o período crítico do desenvolvimento fetal podem, teoricamente, alterar a estrutura e função cerebral, de certa forma idade gestacional ou sensibilidade dependente⁴². A via da gênese dessas anomalias indica que o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é crítico no processo do neurodesenvolvimento do conceito tanto em seres humanos como em animal de experimentação. Nesse sentido, várias teorias têm dado suporte a hipótese de que o sistema imune da gravidez associado a fatores estressantes, incluindo infecciosos, podem alterar de forma negativa o desenvolvimento do cérebro humano durante a organogênese, podendo produzir anomalias congênitas, além de alterações do comportamento e da

função neurocognitiva dos recém-nascidos; com evidência mais forte para esquizofrenia e autismo^{37-40,43}.

Infecção urinária representa uma fonte comum de inflamação sistêmica durante a gravidez em mulheres de qualquer idade. Essa associação está bem documentada incluindo coortes e trabalhos controlados para variáveis de confundimento, embora em alguns deles o tamanho amostral seja de conveniência e limitado⁴⁴⁻⁵⁰.

Outro aspecto ainda pouco explorado diz respeito ao relacionamento interpessoal do casal e seu deterioramento com relação à resposta imune da mulher grávida. É possível que esse insulto represente para mãe um fator de risco para doença infecciosa na gravidez. A explicação provável para casais com baixa qualidade de vida é que o estresse emocional na gestante, decorrente de conflitos e hostilidades maritais pode fragilizar o sistema imune, predispondo a mesma a infecções recorrentes, particularmente do trato urinário. Todavia, existem poucos estudos em seres humanos que tenham como justificativa de investigação se o estresse materno compromete efetivamente a resposta imune ou predispõe o recém-nascido a infecção ou dano cerebral. Em modelos animais existe crescente evidência entre estresse pré-natal materno e vários desfechos adversos para os conceptos, entre eles encontram-se as disfunções imunes e doenças infecciosas⁵¹.

Associando as informações sobre infecções clínicas comuns, com manifestações clínicas pouco evidentes em gestantes, o problema ganha magnitude e se transforma em objeto de investigação em saúde pública.



3 Materiais e Métodos

3.1 Local de estudo

Núcleo de Investigação Experimental e Biotério da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG).

3.2 Tipo de estudo

Prospectivo, longitudinal, analítico e de intervenção.

3.3 Seleção

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos os recém-nascidos de 3 ratas Wistar (*Rattus Novergicus Albinus Rodentia Mammalia*), hígidas, prenhas. Os recém-nascidos foram estratificados em três subgrupos:

Grupo I: Oito ratos recém-natos de fêmeas com prenhez normal (controle).

Grupo II: Oito ratos recém-natos de fêmeas que receberam 4 ml/kg de peso de uma suspensão de fezes autógenas a 10%.

Grupo III: Oito ratos recém-natos de fêmeas que receberam 4 ml/kg de peso de uma suspensão de fezes autógenas a 10% e tratadas no dia seguinte com moxifloxacino, dexametasona e extrato de aroeira.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas as fêmeas prenhas que desenvolvessem quaisquer intercorrências que pudessem interferir no curso natural da gestação.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Procedimentos técnicos

Acasalamento

Ratas Wistar, com idade de 90 dias, com pesos corporais entre 270 e 300g, híginas, confinadas em gaiolas de polipropileno e mantidas em temperatura e iluminação controladas, com água e ração ad libitum foram postas para acasalamento. Foram selecionados ratos machos Wistar, com idade de 90 dias e peso corporal entre 300 e 350g, híginos e mantidos sob mesmas condições acima descritas. Foi utilizado o método poligâmico de acasalamento (Harem), no qual, ao final da tarde, três fêmeas para um macho foram postos em gaiola única. Na manhã seguinte foi realizado o esfregaço vaginal colpocitológico, com auxílio de haste de algodão umedecido com água destilada, introduzido na vagina das fêmeas, em movimento giratório e, em seguida, o material coletado foi transferido para lâminas histológicas e observados em microscópio óptico. Foi considerada prenhez positiva a presença de espermatozoide no tampão vaginal mucoso.

Acompanhamento da prenhez

Foram selecionadas 3 ratas que tiveram resultado colposcópico positivo, identificadas como em dia zero do experimento e acondicionadas em gaiolas isoladas até 21º dia, com as condições ambientais adequadas.

Preparo da solução de fezes autógenas

A peritonite fecal foi induzida por meio da inoculação intraperitoneal de suspensão de fezes autógenas a 10%, recém defecadas e coletadas individualmente, por método de ordenha, dos ratos com hábito intestinal regular e sem alterações macroscópicas (sangue, muco ou pus). Dois gramas de fezes foram diluídos em 20 ml de soro fisiológico a 0,9%. Essa mistura a 10% foi homogeneizada e filtrada com gaze no intuito de retirar grandes partículas. A suspensão foi injetada por via

intraperitoneal, na fossa ilíaca esquerda, com agulha 30 x 12mm.

Inoculação da solução de fezes autógenas Foi realizada no 9º dia de prenhez, período crítico da organogênese.

3.4.2 Análise dos grupos

Grupo I (controle): Uma rata prenha no 9º dia de gestação, sem inoculação da solução de fezes autógenas

Grupo II (sem tratamento): Uma rata prenha no 9º dia de gestação recebeu inoculação de 4ml/kg de peso da solução de fezes autógenas

Grupo III (tratado): Uma rata prenha no 9º dia de gestação recebeu inoculação de 4ml/kg de peso da suspensão de fezes autógenas a 10% e foi tratada no dia seguinte com esquema antimicrobiano venoso constituído por injeção de moxifloxacino na dose de 15 mg/kg e dexametasona na dose de 2,5 mg/kg (contidos em colírio de cloridrato de moxifloxacino a 0,5% e fosfato de dexametasona a 0,1%, além de dois mililitros de extrato alcoólico/aquoso da entrecasca de *Schinus terebinthifolius raddi* que foi injetada na cavidade abdominal. Ambos agentes antimicrobianos foram feitos 24 h após a indução da peritonite.

Controle do período gestacional	Análise clínica das ratas prenhas: controle de: peso, temperatura corporal, comportamento, fezes e verificação de eriçamento piloso.
Avaliação fenotípica dos conceptos	Fotografia dos fetos
Medidas do peso corporal dos conceptos	Balança de precisão
Eutanásia dos fetos e craniotomia	Eutanásia com halotano a 100%. Retirada do encéfalo com medidas paquimétricas e peso em balança de precisão
Exame histopatológico	Os cérebros foram removidos e imediatamente fixados em formalina neutra por 3 dias. Os cérebros fixados foram emblocados em parafina e seccionados após desidratação e vitrificação. As secções foram coradas por hematoxilina por 10 minutos após lavagem com xileno e debenzolização por etanol. Em seguida, foram lavadas com água, diferenciadas com ácido clorídrico e etanol antes de corar com eosina por 2 minutos. Após desidratação com etanol e vitrificação por xileno e montagem em lâminas de vidro, as secções foram considerados prontas para exame. Secções do córtex, hipocampo e ventrículo lateral foram observadas em microscópio com aumento de 400X. Para cada parte do cérebro, 5 áreas foram randomicamente selecionadas para análise. As melhores secções foram utilizadas para análise final.
Análise histomorfométrica	Imagens de microscopia com magnificação de 400x foram digitalizadas. Para calcular a contagem de núcleos celulares, a área ocupada pelas células e a área total da imagem estudada (densidade neuronal), foi usado o <i>software</i> ImageJ. O ImageJ é um <i>software</i> aberto, que utiliza plataforma de programação baseado em linguagem de computação Java, sendo amplamente utilizado em pesquisas científicas que envolvem quantificação e análise de imagens ^{52,53} .

3.4.3 Procedimentos analíticos

Os parâmetros das variáveis quantitativas foram expressos pelas suas médias e desvios-padrão. Nos casos em que o grau de dispersão foi alto, foram expressos por suas médias e erro padrão da média (EPM) e as variáveis qualitativas foram expressas por suas frequências absolutas e relativas. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para testar a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes. Foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunn para avaliação de diferenças entre os subgrupos estudados. Foi utilizado $p < 0,05$ para rejeitar a hipótese de nulidade.

3.4.4 Procedimentos éticos

Os ratos receberam cuidados em concordância com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório”, respeitando-se os “Princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA). O projeto de investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/CESED).



4 Resultados

Ao se avaliar o peso dos encéfalos dos ratos recém-nascidos, pode-se observar aumento significativo do peso dos encéfalos dos ratos do grupo que sofreu a peritonite fecal autógena e que não foi realizado nenhum tipo de tratamento (Tabelas 1, 2 e Figura 1).

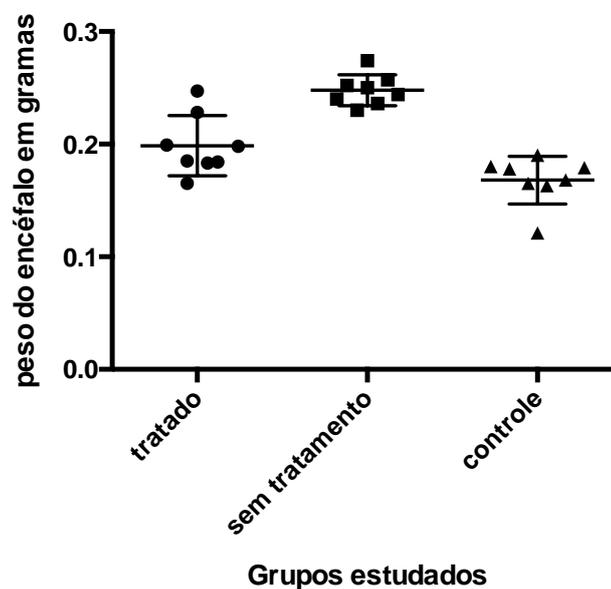
Tabela 1. Estatística descritiva dos pesos dos encéfalos dos três grupos estudados.

Estatística	Grupos		
	I (controle) n=8	II (sem tratamento) n=8	III (tratado) n=8
Mínimo	0,1650	0,2300	0,1210
25% percentile	0,1833	0,2370	0,1635
Mediana	0,1915	0,2470	0,1730
75% percentile	0,2208	0,2558	0,1798
Máximo	0,2470	0,2740	0,1900
Média	0,1986	0,2479	0,1680
Desvio padrão	0,02667	0,01376	0,02102
Erro padrão da media	0,00942	0,00486	0,00743

Teste de Kruskal-Wallis – p= 0,0002.

Tabela 2. Estatística analítica do peso dos encéfalos dos três grupos estudados.

Teste de comparação de Dunn	Significante	p-valor
Sem tratamento vs. Tratado	Não	0,0677
Controle vs. tratado	Não	0,2139
Controle vs. sem tratamento	Sim	0,0001

**Figura 1.** Distribuição dos pesos dos encéfalos nos três grupos.

Utilizando a ferramenta de contagem celular do software Image J, as imagens coradas em hematoxilina e eosina foram descoradas por meio de transformação da mudança de sua qualificação para imagem em 8-bit. Utilizando a ferramenta *subtract background*, as impurezas e partículas menores constantes na imagem foram removidas. (Figura 2.b).

As imagens em resolução 8-bit e já sem impurezas foram submetidas a ferramenta *Binary*, que por meio de um valor de mediana de pixels, dividiu partículas mais densas em imagens escuras e partículas oriundas de tecidos de menos densidade em imagem branca. A seguir foi utilizada a ferramenta *Watershed* que por meio de confecção de marcas d'água separa núcleos de células que por ventura tenham se fundido na imagem. Por fim, a ferramenta *nucleus counter* realizou o

processamento final com a contagem dos núcleos celulares presentes na imagem. (Figura 3).

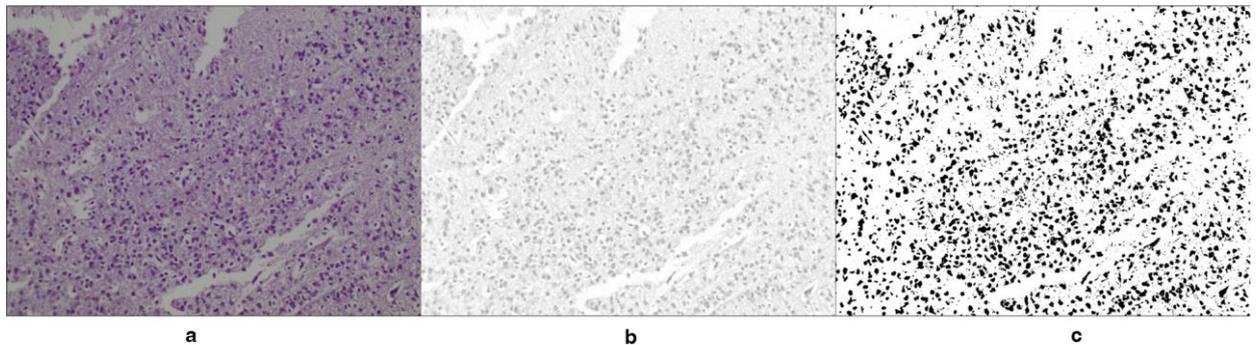


Figura 2. Etapas de processamento da imagem no *software ImageJ* a) Imagem histopatológica inicial com coloração em hematoxilina e eosina. b) Imagem em padrão 8-bit com diminuição de partículas menores. c) Imagem binária (preto/branco) finalizada para realização da contagem celular.

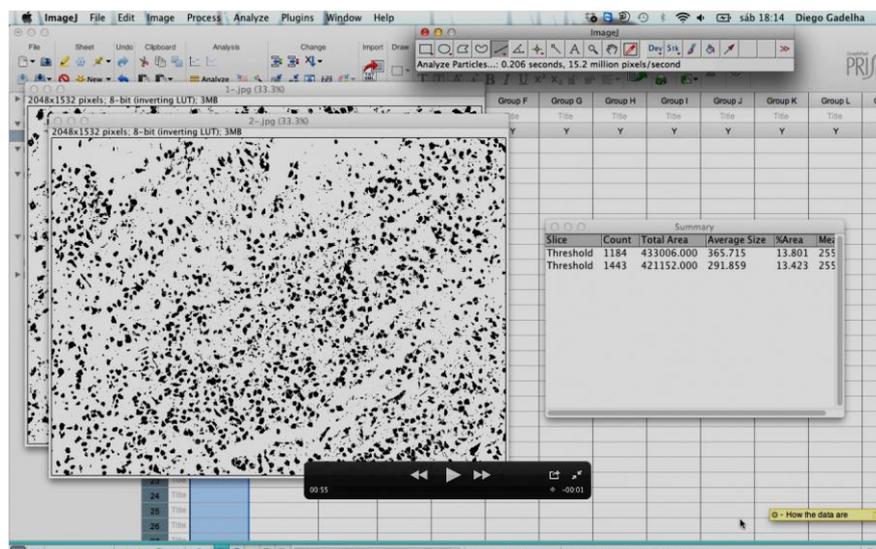


Figura 3. Processamento final da imagem com contagem de seus núcleos celulares.

Ao avaliar a contagem celular, observa-se que este parâmetro está significativamente reduzido no grupo sem tratamento. (teste de Kruskal-Wallis – $p=0,0004$) (Tabelas 3, 4 e Figura 4).

Tabela 3. Contagem celular das imagens obtidas nos três grupos.

	Grupos		
	I (controle)	II (sem tratamento)	III (tratado)
Contagem celular	n=8	n=8	n=8
Contagem mínima	1148	765	1094
25% percentil	1210	859	1299
Mediana	1299	901,5	1599
75% percentil	1541	1077	1753
Maximo	1757	1101	1856
Média	1374	942,6	1532
Desvio padrão	205,9	121,7	271,9
Erro padrão da média	72,8	43,02	96,14

Tabela 4. Comparações múltiplas da contagem celular das imagens obtidas entre os três grupos.

Teste de comparação de Dunn	Significante?	p-valor
Sem tratamento vs. Controle	Sim	0,0089
Tratado vs. Controle	Não	>0,9999
Tratado vs. Sem tratamento	Sim	0,0006

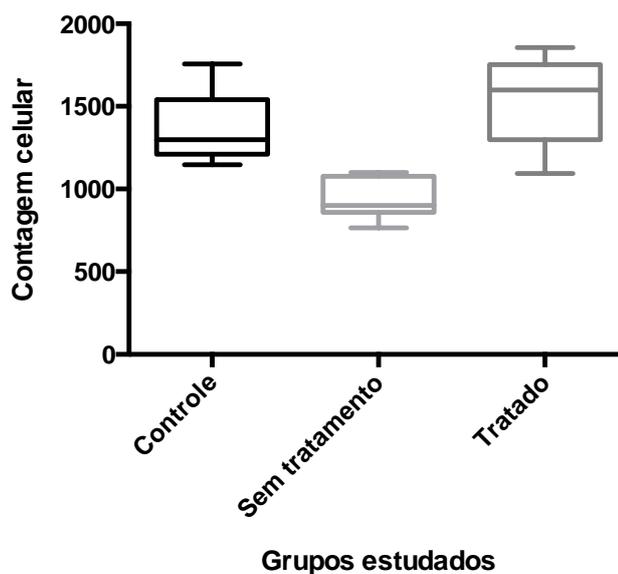


Figura 4 -Box-plot da distribuição da contagem celular pelos grupos.

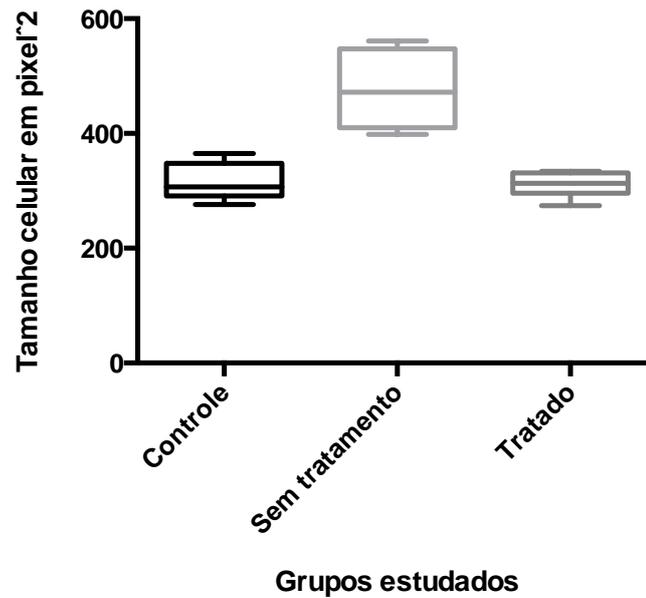
Em relação ao parâmetro tamanho celular (pixel 2×10^3), observa-se um aumento do tamanho médio das células do grupo sem tratamento. (Kruskal-Wallis test – $p=0.0005$)(Tabelas 5, 6 e Figura 5).

Tabela 5. Estatística descritiva do parâmetro tamanho celular nos grupos estudados.

Estatística	Grupos		
	I (controle) n=8	II (sem tratamento) n=8	III (tratado) n=8
Mínimo	276.0	398.0	274.0
25% Percentil	291.0	409.8	295.8
Mediana	306.5	471.5	313.0
75% Percentil	347.8	547.3	331.0
Máximo	365.0	561.0	334.0
Média	314.9	477.0	311.1
Desvio Padrão	32.19	63.98	21.00
Erro padrão da média	11.38	22.62	7.424

Tabela 6. Comparações múltiplas do tamanho celular entre os três grupos.

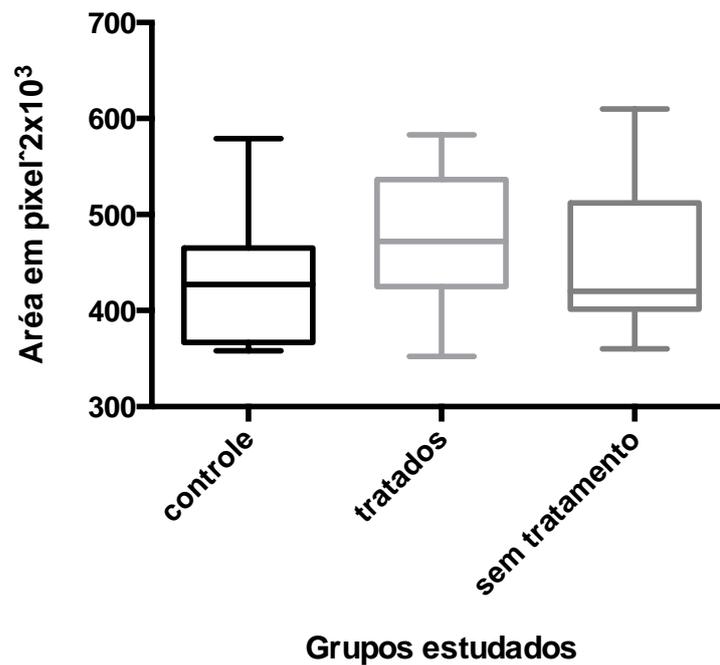
Comparações múltiplas de Dunn	Significante?	p-valor
Sem tratamento vs. Controle	Sim	0.0018
Grupo tratado vs. Controle	Não	>0.9999
Grupo tratado vs. Sem tratamento	Sim	0.0023

**Figura 5.** Distribuição do tamanho celular nos três grupos.

Ao analisar a área total das imagens estudadas, observa-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dessas variáveis nos três grupos estudados, (Kruskal-Wallis test – $p=0.4428$) (Tabela 8, e Figura 6).

Tabela 7. Comparações múltiplas entre os grupos estudados para área estudada.

Comparações múltiplas de Dunn	Significante?	p-valor
Tratado vs. controle	Não	0.6877
Sem tratamento vs. controle	Não	>0.9999
Sem tratamento vs. Tratado	Não	0.9924

**Figura 6.** Distribuição das áreas das imagens analisadas entre os três grupos.



5 *Discussão*

5.1 Escolha do tema

Septicemia é uma condição que ameaça a vida e tem se constituído uma das maiores cargas para saúde pública tanto nos países industrializados como aqueles em desenvolvimento. As dificuldades para o diagnóstico de certeza e a abordagem terapêutica mais adequada fazem variar muito os aspectos epidemiológicos dessa doença, dificultando estimativa mais acurada da incidência¹. Revisão sistemática de recente evidência é desejável tendo presente as mudanças ocorridas não apenas no século XX, mas, sobretudo as que estão acontecendo no século XXI. Estas alterações acontecem na epidemiologia, na microbiologia e nas incertezas da aquisição de resistência, pelos micro-organismos, aos antibióticos cada vez mais complexos e de alto custo. O que torna essa condição ainda mais assustadora é a evidência cada vez mais forte de que os micro-organismos multirresistentes que anteriormente colonizavam os pacientes hospitalares, sobretudo aqueles que se internavam em unidades de terapia intensiva (UTI), são agora cultivados no sangue de pacientes que desenvolvem septicemia na comunidade²⁻⁴.

A septicemia está associada a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) causada pela invasão de microrganismos na corrente circulatória sistêmica, podendo ser acompanhada por choque séptico e falência de vários órgãos. Esta doença acomete entre 1% e 2% dos pacientes hospitalizados e apresenta prevalência de até 25% dos pacientes internados em UTI. Como consequência essa enfermidade pode causar milhões de morte por ano no mundo. O retardo no diagnóstico e tratamento efetivo constituem as principais causas dessa alta morbidade e mortalidade^{4,5}.

Tem havido aumento do interesse no reconhecimento de biomarcadores que ajudem no manuseio diagnóstico e terapêutico dessa doença grave, sobretudo na fase inicial aguda. De uma forma geral, eles são denominados de reagentes da fase aguda da septicemia. Esses biomarcadores ou reagentes constituem um grupo de proteínas plasmáticas que aumentam ou diminuem em resposta ao processo inflamatório. A resposta inapropriada para a gravidade do estímulo inflamatório é mediada por citocinas pró-inflamatórias tais como: Interleucina (IL) 6; IL1; fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interferon gama. Essas citocinas são produzidas por macrófagos, monócitos e outras células participantes da resposta inflamatória e da produção de reagentes da fase aguda^{6,7}.

A ativação desses biomarcadores guarda relação com endotoxemia e lipopolissacarídeos (LPS) circulantes que podem atravessar a barreira placentária e se manifestar por danos nos conceptos, particularmente nos sistemas que apresentam maior complexidade no seu desenvolvimento, tornando o sistema nervoso central um dos principais alvos⁷⁻¹⁴.

LPS é um forte indutor da imunidade inata. Seus efeitos são mediados por suas interações com membros da família dos receptores "*Toll-like*". A exposição pré-natal de LPS está associada a várias doenças nos recém-nascidos particularmente no sistema nervoso central, no cardiovascular e no sistema imune^{15,54}.

Já existe evidência de que a inflamação no sistema nervoso central, causada por LPS durante a gravidez¹⁶⁻¹⁸, compromete a capacidade de memória e a habilidade de aprendizagem de recém-nascidos de ratas e esse comprometimento pode ser atenuado com o uso materno de sulfato de magnésio⁵⁵.

Em seres humanos a apresentação de LPS ao embrião ou feto intraútero pode ocorrer quando há desenvolvimento de infecções na cavidade abdominal, como é caso do desenvolvimento de apendicite aguda na gravidez¹⁹. Nessa circunstância, pode ocorrer microcefalia e importantes agravos no neurodesenvolvimento⁵⁶.

A importância crescente do problema da infecção como agente de agravo, doença, morbidade e mortalidade da septicemia colocando em risco os conceptos humanos^{19,56} e a própria existência da humanidade constituíram as bases para a escolha do tema na peculiaridade do impacto dessa condição na gestação de um animal de experimentação, além do uso adequado de monoterapia antimicrobiana⁴, associada ao uso de um antisséptico natural, de origem vegetal, de extenso uso na cultura popular das classes menos favorecidas, tendo como finalidade possibilitar a

translação do conhecimento obtido para espécie humana, sonhando com a melhoria da qualidade de vida da mesma.

5.2 Escolha da ferramenta de investigação histomorfométrica

A contribuição da tecnologia de histomorfometria em imagens de secções de diversos tecidos humanos e em animais de experimentação tem sido reconhecida por vários pesquisadores na área de medicina, sobretudo na histopatologia. Existem vários sistemas disponíveis para contagem e mensuração de estruturas e elementos celulares, particularmente para morfometria, com a finalidade de estimar a densidade nuclear. Vários desses sistemas, entretanto são de alto custo e requerem memória só disponível em computadores sofisticados. Nesse contexto, a escolha do “Image J” que está disponibilizado em domínio público gratuito baseado no “Java” torna a histomorfometria automatizada de fácil acesso e confiável.

Este “software” foi desenvolvido e disponibilizado para os pesquisadores pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos. Assim, atualmente o “Image J” rodado na plataforma “Macintosh” é largamente usado por pesquisadores da área de saúde^{52,53,57}.

A contagem celular pode ser similar a técnica usada na hematologia, levando em consideração a área de distribuição dos núcleos, permitindo calcular, no caso do presente estudo, a densidade neuronal das secções do cérebro dos animais dos três grupos envolvidos na pesquisa. Isso é possível com a digitalização da imagem e a contagem automatizada é feita diretamente da tela do computador. Nessa circunstância, os núcleos virtualmente são coloridos de forma específica para a contagem. Em contraste com as outras estruturas, na área especificamente determinada, são negativamente coloridas (ausência de cor) ou com outras cores diferentes dos núcleos.

Finalmente, o “Image J” gera a densidade neuronal de forma automática que é alimentada no “software” de estatística para o estudo analítico.

A escolha do método automatizado de histomorfometria através de imagens das secções, no estudo atual, tornou uma opção custo benefício de grande valia. Pode-se especular que outros métodos histomorfométricos^{58,59}, poderiam levar a resultados absolutos distintos, todavia, a densitometria neuronal (número de

neurônios por unidade de área de imagem digitalizada) deve ser considerada como confiável.

5.3 Resultados

Inicialmente, o aumento da média de peso dos encéfalos dos conceptos das ratas submetidas à peritonite fecal, sem intervenção terapêutica, deve ser atribuído ao aumento de líquido no interstício celular do cérebro dos mesmos, já que macroscopicamente podia-se observar fluido orgânico porejando do mesmo. A provável explicação para esse “inchaço” do cérebro, e conseqüentemente maior peso, se deva ao processo inflamatório decorrente da passagem de endotoxinas, em especial LPS, da corrente sanguínea materna para a circulação sistêmica do conceito, produzindo dano no cérebro e conseqüentemente morte celular (apoptose neuronal). Pode-se levantar a hipótese de que a septicemia materna, resultante da peritonite autógena fecal determine, como via final, corioamnionite e conseqüente liberação de toxinas na corrente sanguínea do conceito, afetando de forma danosa o encéfalo.

Outro mecanismo concomitante seria o aumento das citocinas pró-inflamatórias como: IL6, IL1, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interferon gama^{6,7}. O significativo aumento de volume celular nos neurônios do grupo de conceptos de mães não tratadas possivelmente se deva ao mecanismo de aumento de fluido intracelular ou de hipertrofia dos mesmos.

Os antimicrobianos empregados parecem ter exercido certa proteção para os cérebros dos conceptos das ratas desse grupo tratado. Destaque deve ser feito para administração de um antisséptico natural (extrato hidroalcoólico da entrecasca da *Schinus terebinthifolius raddi*), visto que no inventário da cavidade abdominal desses animais não foram observadas lesões residuais que indicassem ter havido infecção prévia grave. Adicionalmente, a avaliação macroscópica do cérebro se assemelhava a dos removidos do grupo controle.

5.4 Fragilidades do trabalho

O peso dos encéfalos é de pouca precisão nos conceptos das ratas mães que não receberam tratamento para peritonite autógena grave. Isto se deve ao fato de que esses órgãos estão muito amolecidos e porejando fluido. Se o encéfalo é colocado no

prato da balança logo após a remoção o peso é aparentemente influenciado pelo edema. Todavia, se a verificação do peso é feito após algum tempo, especialmente se colocado em repouso em material que absorver fluido o peso pode diminuir comprometendo o resultado final. Deve ser ressaltado que esse fenômeno não alteraria a densidade neuronal do cérebro, que é o cerne da atual investigação.

O emblocamento do encéfalo em parafina foi realizado de forma que todas as estruturas estivessem no mesmo plano para o corte e produção das seções para análise. Todavia, existe a possibilidade de que elas não estivessem exatamente na mesma posição. Essa possibilidade não deve ter interferido nos resultados, pois a mesma situação ocorreu nos três grupos incluídos no estudo. Do ponto de vista de probabilidade, ela dilui ou mesmo exclui qualquer tendenciosidade intencional ou sistemática. Além disso, essa possibilidade pode ser minimizada pelo fato de que a comparação entre as áreas das imagens não expressam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, demonstrando que a análise de contagem nuclear foi realizada em imagens de áreas equivalente, mesmo em grupos distintos.

A captura das imagens das lâminas a serem analisadas seguiu o mesmo protocolo. Ainda assim, existiria a possibilidade de que elas pudessem variar com o foco da relação das lentes objetiva e ocular em alguma captura de imagem. Entretanto, com o argumento similar esse possível erro seria diluído nos três grupos não afetando o desfecho de cálculo estimativo e não interferiria nos resultados finais.

Deve-se considerar que o esquema antimicrobiano tendo como base o cloridrato de moxifloxacino na dose (15 mg/kg) administrada às ratas prenhas pode ter exercido nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e alteração no equilíbrio redox do fígado das mesmas, que, em teoria, poderia alterar o estado de saúde das mesmas e, em consequência, possibilitar o dano no encéfalo dos conceptos⁶⁰. Nessa circunstância, a administração do esquema antimicrobiano empregado pode ser considerada uma variável de confusão.

5.5 Considerações finais

O desafio de prevenir anomalias congênitas em seres humanos é grande em razão da probabilidade crescente de insultos ao binômio mãe/feto de várias naturezas incluindo: interações genéticas pouco conhecidas, infecções virais, bacterianas e

fúngicas; além de fatores ambientais como irradiação, drogas tóxicas, efeitos colaterais de diversos medicamentos, hábitos pouco saudáveis, alimentação inadequada com insuficiência de certos nutrientes, estresse, além de muitos outros que são ainda desconhecidos, o que torna o adjetivo “idiopático” frequentemente usado na gênese dessas doenças.

Deve-se chamar atenção para infecções bacterianas de baixa morbidade e mortalidade como, por exemplo, infecção urinária, doença inflamatória pélvica e corioamnionite em gestantes, que tendem a determinar endotoxemia e se apresentadas no primeiro trimestre da gravidez podem resultar em dano cerebral com desenvolvimento de várias doenças neuropsiquiátricas nos recém-nascidos, podendo inclusive desenvolver doenças permanentes que modifiquem profundamente a qualidade de vida desses indivíduos.

No trabalho atual pode-se inferir que infecção sistêmica grave (septicemia) a partir de peritonite fecal autógena, em ratas Wistar prenhas na fase mais ativa da organogênese está associada a encefalomalácia e diminuição significativa da densidade neuronal. Por outro lado, uma intervenção antimicrobiana agressiva e precoce pode mitigar o dano produzido por esse insulto muito agressivo. Além do mais, fazendo a translação para seres humanos, o uso inadequado ou tardio do tratamento antimicrobiano de doenças infecciosas em gestantes com aparente baixa morbidade, pode estar associada a enfermidades neuropsiquiátricas consideradas de gênese desconhecida. O manuseio precoce e adequado dessas infecções pode reduzir a incidência dessas enfermidades e suas consequências tardias para a espécie humana. Prevenção permanece como item importante na melhoria da qualidade de vida da coletividade humana.



Referências

1. Tsertsvadze A, Royle P, McCarthy N. Community-onset sepsis and its public health burden: protocol of a systematic review. *Syst Rev.* 2015; 4(1):119. doi: 10.1186/s13643-015-0103-6.
2. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Br. Med. J.* 2003; 326:262-6.
3. Wu J, Liren Hu L, Zhang G, Wu F, He T, Accuracy of presepsin in sepsis diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0133057. Published online 2015 Jul 20. doi: 10.1371/journal.pone.0133057
4. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T, Jaton K, Giulieri S, Delaloye J, Opal S, Tracey K, van der Poll T, Pelfrene E. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(5):581-614. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70112-X.
5. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcome of infection in intensive care unit. *JAMA* 2009; 302:2323–9. doi: 10.1001/jama.2009.1754
6. Markanday A. Acute phase reactants in infections: Evidence based review: and a guide for clinicians. 2015; *Acute Phase Reactants in Infections* DOI: 10.1093/ofid/ofv098.
7. Aziz M, Jacob A, Yang WL, Matsuda A, Wang P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2012.
8. Baharnoori M, Bhardwaj KS, and Srivastava LK. Effect of Maternal Lipopolysaccharide Administration on the Development of Dopaminergic Receptors and Transporter in the Rat Offspring. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54439.

9. Bilbo SD, Schwarz JM. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci*. 2009;3:14.
10. Patterson PH. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12:115–118.
11. Schlotz W, Phillips DI. Fetal origins of mental health: evidence and mechanisms. *Brain Behav Immun*. 2009;23:905–916
12. Oskvig DB, Elkahoun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun*. 2012;26(4):623-34.
13. Ghiani CA, Mattan NS, Nobuta H, Malvar JS, Boles J, Ross MG, Waschek JA, Carpenter EM, Fisher RS, de Vellis J. Early effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on foetal brain development in rat. *ASN Neuro*. 2011; 17;3(4)
14. Baharnoori M, Bhardwaj SK, Srivastava LK Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophr Bull*. 2012; 38(3):444-56.
15. Mouihate A. Prenatal immune stress in rats dampens fever during adulthood. *Dev Neurosci*. 2012; 34(4): 318-26.
16. Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res*. 1997;42:1–8.
17. Grether JK, Nelson KB. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birthweight. *JAMA*. 1997;278:207–211.
18. Wu YW, Colford JM Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: a meta-analysis. *JAMA*. 2000;284:1417–1424.
19. Ács N, Bánhidly F, Czeizel AE. Primary microcephaly in two children born to mothers with complicated appendicitis or late appendectomy during pregnancy. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2009; 85(7): 655–656.
20. Buyne OR, Bleichrodt RP, Verweij PE, Groenewoud HM, van Goor H, Hendriks T. A peritonitis model with low mortality and persisting intra-abdominal abscesses. *Int J Exp Pathol*. 2006;87(5):361-8.
21. Giacometti A, Silvestri C, Oscar Cirioni O, Bozzi A, Barra D, Ghiselli R, Di Giulio A, Saba V, Mocchegiani F, Scalise G, Luzi C, Orlando F, Mangoni ML, Rinaldi AC. Interaction of antimicrobial peptide temporin L with lipopolysaccharide in vitro and

- in experimental rat models of septic shock caused by gram-negative bacteria. *Antimicrobiol Agents Chemother.* 2006; 50(7): 2478–86. doi:10.1128/AAC.01553-05.
22. Moore LJ, Moore FA, Todd SR, Jones SL, Turner KL, Bass BL. Sepsis in general surgery: the 2005 2007 national surgical quality improvement program perspective. *Arch Surg.* 2010;145:695–700.
 23. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101:1644–55.
 24. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *CritCare Med.* 2003;31:1250–1256.
 25. Martin GS, Mannino DM and Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med.* 2006;34: 15-21.
 26. Edgeworth JD, Treacher DF, Eykyn SJ. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit. Care Med.* 1999, 27:1421-28.
 27. Martino R, Santamaria A. Muñoz L, Pericas R, Altes A, G. Prats, G Sierra J. Bacteremia by gram-negative bacilli in patients with hematologic malignancies. comparison of the clinical presentation and outcome of infections by enterobacteria and non-glucose-fermenting gram-negative bacilli. *Acta Haematol.* 1999; 102:7-11.
 28. Adar T, Grisaru-Granovsky S, Ben Ya'acov A, Goldin E, Bar-Gil Shitrit A. Pregnancy and the immune system: General overview and the gastroenterological perspective. *Dig Dis Sci.* 2015; 60(9):2581-9. doi: 10.1007/s10620-015-3683-z
 29. Kallapur SG, Presicce P, Rueda CM, Jobe AH, Chougnet CA. Fetal immune response to chorioamnionitis. *SeminReprod Med.* 2014; 32(1):56-67. doi: 10.1055/s-0033-1361823.
 30. Nitsos I, Rees SM, Duncan J, Kramer BW, Harding R, Newnham JP, et al. Chronic exposure to intra-amniotic lipopolysaccharide affects the ovine fetal brain. *J SocGynecolInvestig.* 2006; 13:239–47.

31. Gavilanes AW, Strackx E, Kramer BW, Gantert M, Van den Hove D, Steinbusch H, et al. Chorioamnionitis induced by intraamniotic lipopolysaccharide resulted in an interval-dependent increase in central nervous system injury in the fetal sheep. *American j Obst Gynecol.* 2009; 200:437, e431–438.
32. Lanté F, Meunier J, Guiramand J, De Jesus Ferreira MC, Cambonie G, Aimar R, Cohen-Solal C, Maurice T, Vignes M, Barbanel G. Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus.* 2008; 18(6):602-9. doi: 10.1002/hipo.20421.
33. Burd I, Balakrishnan B, Kannan S. Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *Am J Reprod Immunol.* 2012; 67(4):287-94. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01110.x.
34. Fortier, M. E.; Joober, R.; Luheshi, G.N.; Boksa, P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offsprings. *J Psychiatr. Res.* 38:335-345; 2004
35. Hava, G.; Vered, L.; Yael, M.; Mordechai, H.; Mahoud, H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev. Psychobiol.* 48:162-168; 2006.
36. Vargas,DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA: Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autismo. *Ann Neurol* 2005;57 :67-81.
37. Dommergues MA, Plaisant F, Verney C, Gressens P: Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: a potential target for neuroprotection. *Neuroscience* 2003;121:619-628.
38. Burd I, Balakrishnan B, Kannan S. Modelsof fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *Am J ReprodImmuno* 2012; 67:287-295.
39. Bell MJ, Hallenbeck JM, Gallo V: Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatr Res* 2004; 56:541-546.
40. Zupan V, Gonzalez P, Lacaze-Masmonteil T, Boithiasd'Allest AM, Dethan M, Gabilan JC: Periventricular leukomacia: risk factors revisited. *DevMedChildNeurol* 1996; 38:1061-1067.
41. Cordeiro CN, Tsimis M, Burd I. Infections and brain development. *Obstet Gynecol Surv.* 2015; 70(10):644-55. doi: 10.1097/OGX.0000000000000236.

42. Easter SR, Cantonwine DE, Zera CA, Lim KH, Parry SI, McElrath TF. Urinary tract infection during pregnancy, angiogenic factor profiles, and risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2015. pii: S0002-9378(15)01215-6. doi: 10.1016/j.ajog.2015.09.101.
43. Glaser AP, Schaeffer AJ. Urinary Tract Infection and Bacteriuria in Pregnancy. *UrolClin North Am.* 2015; 42(4):547-60. doi: 10.1016/j.ucl.2015.05.004
44. Amiri M, Lavasani Z, Norouzirad R, Najibpour R, Mohamadpour M, Nikpoor AR, Raeisi M, ZareMarzouni H. Prevalence of urinary tract infection among pregnant women and its complications in their newborns during the birth in the hospitals of Dezful City, Iran, 2012 - 2013. *Iran RedCrescentMedJ.* 2015;17(8):e26946. doi: 10.5812/ircmj.26946.
45. Onu FA, Ajah LO, Ezeonu PO, Umeora OU, Ibekwe PC, Ajah MI. Profile and microbiological isolates of asymptomatic bacteriuria among pregnant women in Abakaliki, Nigeria. *InfectDrugResist.* 2015;8:231-5. doi: 10.2147/IDR.S87052
46. Schneeberger C, Geerlings SE, Middleton P, Crowther CA. Interventions for preventing recurrent urinary tract infection during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; 7:CD009279. doi: 10.1002/14651858.CD009279.pub3.
47. Babic U, Opric D, Perovic M, Dmitrovic A, Mihailovic S, Kocijancic D, Radakovic J, Dugalic MG. Influence of regularity of checkups during pregnancy on prevalence of asymptomatic bacteriuria and maternal behaviors regarding urinary infection prevention. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2015;42(2):208-11
48. Matuszkiewicz-Rowińska J, Małyszko J, Wieliczko M. Urinary tract infections in pregnancy: old and new unresolved diagnostic and therapeutic problems. *Arch Med Sci.* 2015; 11(1):67-77. doi: 10.5114/aoms.2013.39202.
49. Henriksen RE, Thuen F. Marital quality and stress in pregnancy predict the risk of infectious disease in the offspring: The Norwegian Mother and Child Cohort Study. *PLoS One.* 2015 Sep 30;10(9):e0137304. doi: 10.1371/journal.pone.0137304
50. Atacag T, Yayci E, Guler T, Suer K, Yayci F, Deren S, Cetin A. Asymptomatic bacteriuria screened by catheterized samples at pregnancy term in women undergoing cesarean delivery. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2015;42(5):590-4.
51. Blomström Å, Gardner RM, Dalman C, YolkenRH, Karlsson H. Influence of maternal infections on neonatal acute phase proteins and their interaction in the

- development of non-affective psychosis. *Transl Psychiatry* 2015; 5, e502; doi:10.1038/tp.2014.142
52. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to Image J: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; (7): 671–5.
53. Girish V, Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer* 2004;41:47.
54. Chen X, Tang Y, Gao M, Qin S, Zhou J, Li X. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in myocardial fibrosis in rat offspring. *Int J Mol Sci.* 2015 May 14;16(5):10986-96. doi: 10.3390/ijms160510986.
55. Lamhot VB, Khatib N, Ginsberg Y, Anunu R, Richter-Levin G, Weiner Z, Ross MG, Divon MY, Hallak M, Beloosesky R. Magnesium sulfate prevents maternal inflammation-induced impairment of learning ability and memory in rat offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;pii: S0002-9378(15)00792-9. doi: 10.1016/j.ajog.2015.07.042.
56. Melo MCSC, França Neto AH, Gadelha DNB, Silva LAC. Alterações congênitas encefálicas e oculares após gravidez complicada por septicemia: Relato de caso. *TEMA - Revista Eletrônica de Ciências.* 2014; 15 (22;23), ISSN 2175-9553.
57. Tchoukalova YD, Harteneck DA, Karwoski RA, Tarara J, Jensen MD. A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing. *J Lipid Res.* 2003;44:1795-801.
58. Dehghani F, Hassanpour A, Poost-pasand A, Noorafshan A, Karbalay-Doust S. Protective effects of L-carnitine and hogenized testis tissue on the testis and sperm parameters of busulfan-induced infertile male rats. *Iran J Reprod Med.* 2013; 11(9): 693-704.
59. Slyfield CR, Tkachenko EV, Wilson DL, Hernandez CJ. Three-dimensional dynamic bone histomorphometry. *J Bone Miner Res.* 2012; 27(2): 486-95.
60. Ore A, Olayinka ET. Influence of moxifloxacin on hepatic redox status and plasma biomarkers of hepatotoxicity and nephrotoxicity in rat. *Biochem Res Int.* 2015;2015:192724. doi: 10.1155/2015/192724, PMID: PMC4621322.



Apêndice

APÊNDICE A – ARTIGO 01 – ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Impact of prenatal antimicrobial treatment on fetal brain damage due to autogenous fecal peritonitis in Wistar rats: A histomorphometric study

Neylane Nyéria Coelho Batista Gadelha,^a Diego Nery Benevides Gadelha,^b Alexandre Rolim da Paz,^c Maria Cecília Santos Cavalcanti Melo,^d Thárcia Kiara Beserra Oliveira,^e Carlos Teixeira Brandt^f

^a Fellow MSc degree, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil. Assistant Professor, Department of Ophthalmology, Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM), Address: Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901, 58411020, Campina Grande, PB, Brazil. Tel.: +55-83-981058023 / +55-83-2101-8800. Email: neylanecoelho@hotmail.com

^b PhD, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Recife, PE, Brazil. Associate Professor, Department of Ophthalmology, FCM, Address: Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901, 58411020, Campina Grande, PB, Brazil. Tel.: +55-83-981058023 / +55-83-2101-8800. Email: diegogadelha@hotmail.com

^c Assistant Professor, Pathology, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil. Address: Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901, 58411020, Campina Grande, PB, Brazil. Tel.: +55-83-981058023 / +55-83-2101-8800. Email: rolimpaz@yahoo.com.br

^d Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Recife, PE, Brazil. Assistant Professor, Department of Ophthalmology, FCM, Address: Av. Senador

Argemiro de Figueiredo, 1901, 58411020, Campina Grande, PB, Brazil. Tel.: +55-83-981058023 / +55-83-2101-8800. Email: melo.cecilia@terra.com.br

^e Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Agricultural Engineering, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Address: Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901, 58411020, Campina Grande, PB, Brazil. Tel.: +55-83-981058023 / +55-83-2101-8800. Email: tharcia_kiara@hotmail.com

^f PhD, Head, Scientific Methodology and Pediatric Surgery, UFPE, Recife, PE, Brazil. Scientific director of FCM, Address: Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901, 58411020, Campina Grande, PB, Brazil. Tel.: +55-83-981058023 / +55-83-2101-8800. Email: carlosbrandt@bol.com.br

Research performed at Laboratory of Experimental Surgery, Department of Surgery, Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brazil. Part of Master degree thesis, Postgraduate Program in Surgery, Universidade Federal de Pernambuco. Advisor: Carlos Teixeira Brandt.

Subject to be publish under: Medical Science

Keywords: peritonitis, brain injuries, rats

Corresponding author

Neylane Nyéria Coelho Batista Gadelha
Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901
58411-020 - Campina Grande, PB
Brazil

neylanecoelho@hotmail.com

Tel.: +55-83-98105-8023 / +55-83-2101-8800

Financial disclosure: The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Impact of prenatal antimicrobial treatment on fetal brain damage due to autogenous fecal peritonitis in Wistar rats: A histomorphometric study

ABSTRACT

Purpose: To investigate brain neuronal density in newborn rats whose mothers were subjected to fecal peritonitis and compare findings between rats born to mothers treated and not treated with antimicrobials.

Methods: Peritonitis was induced with a 10% fecal suspension (4 mL/kg) in 2 pregnant rats. Of these, 1 received antimicrobial treatment 24 hours after peritonitis induction: moxifloxacin and dexamethasone plus 2 mL of the inner bark of the *Schinus terebinthifolius raddi* extract. One pregnant rats underwent no intervention and another one underwent no peritonitis and served as controls.

Results: The newborn brains of rats born to mothers with fecal peritonitis were significantly smaller and of less firm consistency. Brain neuronal density was lower in the untreated group than in the control and treated groups ($P < 0.01$).

Conclusions: Untreated peritonitis caused brain damage in the offspring, which was averted by effective early antimicrobial treatment. This approach may provide an early avenue for translation of such therapy in humans.

Keywords: peritonitis, brain injuries, rats

INTRODUCTION

Sepsis and septic shock are serious clinical problems and remain a major cause of morbidity and mortality in intensive care unit patients. No specific antiseptic treatment is currently available and patient care relies heavily on early recognition, allowing timely interventions—such as antibiotic administration, source control measures if necessary, and resuscitation with intravenous fluids and vasoactive agents (Cohen, Vincent, Adhikari, Machado, Angus, Calandra, Jaton, Giulieri, Delaloye, Opal, Tracey, van der Poll, & Pelfrene, 2015).

Prenatal infection is a stressful experience leading to enhanced susceptibility to mental illness in humans. Pregnancy itself is a unique condition of immune tolerance that cannot be attributed merely to generalized immunosuppression. A number of mechanisms have been proposed, including non-self recognition, immunomodulation of specific inflammatory cell populations, and a Th2-directed immune response, which are mediated by both localized and systemic reactions. Moreover, an inflammatory response toward the conceptus is no longer

regarded as an obligatory deleterious response. Instead, it is considered an important factor required for normal growth and development (Adar, Grisaru-Granovsky, Ben Ya'acov, Goldin, & Bar-Gil Shitrit, 2015).

There is evidence that intrauterine inflammation, such as chorioamnionitis, in animal models can affect microglia, astrocytes, axonal growth, and apoptosis (Gavilanes, Strackx, Kramer, Gantert, Van den Hove, Steinbusch, Garnier, Cornips, Steinbusch, Zimmermann, & Vles, 2009; Kallapur, Presicce, Rueda, Jobe, & Chougnnet, 2014; Lante, Meunier, Guiramand, De Jesus Ferreira, Cambonie, Aimar, Cohen-Solal, Maurice, Vignes, & Barbanel, 2008). In rats, oxidative stress and shortage of glutathione occurred in the fetal brain after maternal lipopolysaccharide administration, and these responses may result in neurodevelopmental deficits in the offspring (Burd, Balakrishnan, & Kannan, 2012).

Studies in animal models of maternal inflammation during pregnancy play a key role in elucidating the mechanisms involved in fetal brain injury associated with exposure to the maternal milieu. Such models have resulted in fetal microglial activation, neurotoxicity, and motor and behavioral deficits in the offspring (Burd et al., 2012).

We have previously demonstrated morphological brain damage in newborn rats whose mothers were subjected to autogenous fecal peritonitis in early pregnancy, and this damage was ameliorated with effective antimicrobial therapy (Brandt, Melo, Gadelha, Gadelha, Oliveira, & Falcao, 2014). However, the histologic findings of this brain damage have not been investigated. The present study was therefore designed to evaluate brain damage in newborn rats whose mothers were subjected to autogenous fecal peritonitis in early pregnancy by means of histologic and histomorphometric analysis of brain neuronal density and compare findings between rats born to mothers treated and not treated with antimicrobials and with normal brain tissue.

METHODS

This prospective study was approved by the Ethics Committee of the Medical School of Campina Grande, Paraiba, Brazil. Animal handling and experimentation followed international standards and guidelines for the care and use of laboratory animals.

The study was conducted in two phases. First, we developed a model of autogenous fecal peritonitis in pregnant Wistar rats aiming to produce significant brain damage in the offspring. On day 9 of pregnancy, 4 mL/kg of autogenously filtered 10% fecal suspension were injected into the abdominal cavity of 2 rats. One pregnant rats underwent no intervention and served as controls. Both infected and uninfected (control) rats were housed in polypropylene

cages and maintained in a ventilated and temperature-controlled chamber ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$) on a standard 12:12 light-dark cycle (lights on at 07:00 AM), with free access to food and tap water. All rats were checked daily until the birth of the offspring.

Second, 1 infected pregnant rats were randomly selected and treated with a single intravenous injection of moxifloxacin (15 mg/kg) and dexamethasone (0.2 mg/kg). Both drugs were injected 24 hours after peritonitis induction. Additionally, 2 mL of the inner bark of the *Schinus terebinthifolius raddi* extract were injected into the abdominal cavity, according to a previous protocol (Melo, Gadelha, Oliveira, & Brandt, 2014).

Immediately after birth, 8 newborn rats from each group (treated, untreated, and control) were separated from their mothers, inspected for any congenital malformation, and weighed on a precision scale. Then, they were euthanized by halothane inhalation and decapitated.

After delivery, the female rats were assessed for findings associated with peritonitis by abdominal and thoracic examination. The morphological characteristics of the newborns were also described, with special attention to the head structures and central nervous system.

Histopathology

The newborn rat brains were carefully removed, weighed on a precision scale, and immediately fixed in 10% buffered formalin for 3 days. The fixed brains were then embedded in paraffin and sectioned after dehydration and vitrification. Sections were deparaffinized with xylene and ethanol and stained with hematoxylin for 10 minutes. Then, sections were washed with water and differentiated with hydrochloric acid and ethanol prior to staining with eosin for 2 minutes. Slides containing sections of the brain cortex, hippocampus and lateral ventricle were arranged in trays and examined under a light microscope at $400\times$ magnification. For each part of the brain, 5 areas were randomly selected for analysis. The best section was used for the final assessment.

Histomorphometric analysis

Microscope images ($400\times$ magnification) were digitized. To calculate the number of cell nuclei, the area occupied by cells and total area of the studied image (neuronal density) were measured using ImageJ (Girish & Vijayalakshmi, 2004; Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). All histomorphometric analyses were performed by a single examiner.

Statistical analysis

Quantitative data were expressed as means (standard deviations) and presented in a box plot. Because the data were non-normally distributed, the Mann-Whitney test was used for unpaired comparisons between mean differences and the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test was used for multiple comparisons among means. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 6.0. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Brain weight was significantly increased in the untreated group compared with control and treated groups ($P = 0.0002$) (Tables 1, 2 and Figure 1).

Table 1 about here

Table 2 about here

Figure 1 about here

Regarding cell count, the number of cells was significantly decreased in the untreated group ($P = 0.0004$) (Table 3, 4 and Figure 2).

Table 3 about here

Table 4 about here

Figure 2 about here

Measurement of brain cells (2×10^3 pixels) showed a significant increase in cell size in the untreated group ($P = 0.0005$) (Table 5, 6 and Figure 3).

Table 5 about here

Table 6 about here

Figure 3 about here

There was no difference in total brain area between the 3 groups ($P = 0.4428$) (Table 7 and Figure 4).

Table 7 about here

Table 8 about here

Figure 4 about here

DISCUSSION

Although infection is a well-known complication of pregnancy, pregnancy-associated severe sepsis (PASS) has not been as well characterized, and only limited population-based data are available. In pregnancies complicated by acute appendicitis, this condition often promotes severe infection, including PASS, and the newborns are at increased risk of adverse outcomes. Thus, delayed or conservative management should be avoided due to the high risk of adverse pregnancy outcomes, and measures should be taken to decrease the risk of peritonitis and its associated morbidities (Abbasi, Patenaude, & Abenhaim, 2014).

In the present study, we further investigated the effect of severe infection due to autogenous fecal peritonitis on the brain of offspring of Wistar rats (Brandt et al., 2014) by comparing rats born to mothers that received no antimicrobial treatment during pregnancy with rats born to mothers that received a very aggressive treatment. The first observation was the histologic confirmation of the macroscopic findings in the brain, particularly the jelly-like appearance of the organ (periventricular leukomalacia) (Brandt et al., 2014). Additionally, the mean brain weight of the newborns of rats that received no antimicrobial treatment was significantly increased compared with treated and control rats, and the most likely explanation is that the untreated newborns developed severe neuro-inflammation in the brain, increasing interstitial fluid infiltration. In this regard, a fluid-like substance pouring from these brains was observed, and the brains were edematous. Consistent with this hypothesis, the mean neuronal density of these brains was significantly decreased compared with treated and control rats.

Reduced neuronal density can also be the end result of neurotoxicity in the central nervous system due to endotoxemia caused by autogenously induced peritonitis and bacterial translocation from the abdominal cavity to the bloodstream (Burd et al., 2012). Apoptosis may also be involved in this process of brain injury associated with neuronal death (Gavilanes et al., 2009; Kallapur et al., 2014; Lante et al., 2008; Nitsos, Rees, Duncan, Kramer, Harding, Newnham, & Moss, 2006). In addition to periventricular leukomalacia, in humans this injury has also been associated with cerebral palsy and a spectrum of neurodevelopmental disorders, such as autism and schizophrenia (Patterson, 2009). However, it remains a matter of debate whether these early histological changes due to a toxic insult from the mothers could be averted by timely, aggressive antimicrobial therapy. The almost normal brain neuronal density lends support to this hypothesis.

An interesting point of discussion, taking into account the extraordinary adaptive mechanism of rats, is whether these animals will recover normal brain function after severe infectious toxicity transmitted from their mothers, due to newborn neuronal plasticity and neurogenesis. Further functional research is warranted to determine the likelihood of this outcome.

CONCLUSIONS

Untreated peritonitis during pregnancy caused brain damage in the offspring of Wistar rats, but effective early antimicrobial treatment prevented the decrease in brain neuronal density. In humans, intra-abdominal infection in pregnant women may be associated with brain damage of their conceptuses, and this may be averted by using appropriate early therapeutic intervention. Because translational evidence is not yet available for the mechanisms investigated in this study, this approach may provide an early avenue for translation of such therapy in humans.

REFERENCES

- Abbasi, N., Patenaude, V., & Abenhaim, H. A. (2014). Evaluation of obstetrical and fetal outcomes in pregnancies complicated by acute appendicitis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 290(4), 661-667. doi: 10.1007/s00404-014-3276-7
- Adar, T., Grisaru-Granovsky, S., Ben Ya'acov, A., Goldin E., & Bar-Gil Shitrit A. (2015). Pregnancy and the immune system: general overview and the gastroenterological perspective. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(9), 2581-2589. doi: 10.1007/s10620-015-3683-z
- Brandt, C. T., Melo, M. C., Gadelha, D. N., Gadelha, N. N., Oliveira, T. K., & Falcao, M. P. (2014). Brain damage and congenital cataract due to autogenously fecal peritonitis in pregnant Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 29(10), 681-687. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25318001>
- Burd, I., Balakrishnan, B., & Kannan, S. (2012). Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *American Journal of Reproductive Immunology*, 67(4), 287-294. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01110.x
- Cohen, J., Vincent, J. L., Adhikari, N. K., Machado, F. R., Angus, D. C., Calandra, T., Jaton, K., Giulieri, S., Delaloye, J., Opal, S., Tracey, K., van der Poll, T., & Pelfrene, E. (2015). Sepsis: a roadmap for future research. *The Lancet. Infectious Diseases*, 15(5), 581-614. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70112-X

- Gavilanes, A. W., Strackx, E., Kramer, B. W., Gantert, M., Van den Hove, D., Steinbusch, H., Garnier, Y., Cornips, E., Steinbusch, H., Zimmermann, L., & Vles, J. (2009). Chorioamnionitis induced by intraamniotic lipopolysaccharide resulted in an interval-dependent increase in central nervous system injury in the fetal sheep. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(4), 431-438. doi: 10.1016/j.ajog.2008.12.003
- Girish, V. & Vijayalakshmi, A. (2004). Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian Journal of Cancer*, 41(1), 47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105580>
- Kallapur, S. G., Presicce, P., Rueda, C. M., Jobe, A. H., & Chougnnet, C. A. (2014). Fetal immune response to chorioamnionitis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(1), 56-67. doi: 10.1055/s-0033-1361823
- Lante, F., Meunier, J., Guiramand, J., De Jesus Ferreira, M. C., Cambonie, G., Aimar, R., Cohen-Solal, C., Maurice, T., Vignes, M., & Barbanel, G. (2008). Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus*, 18(6), 602-609. doi: 10.1002/hipo.20421
- Melo, M. C., Gadelha, D. N., Oliveira, T. K., & Brandt, C. T. (2014). Alcohol extract of *Schinus terebinthifolius raddi* (anacardiaceae) as a local antimicrobial agent in severe autogenously fecal peritonitis in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 29 Suppl 1:52-56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185057>
- Nitsos, I., Rees, S. M., Duncan, J., Kramer, B. W., Harding, R., Newnham, J. P., & Moss, T. J. (2006). Chronic exposure to intra-amniotic lipopolysaccharide affects the ovine fetal brain. *Journal of the Society of Gynecology Investigation*, 13(4), 239-247. doi: 10.1016/j.jsigi.2006.02.011
- Patterson, P. H. (2009). Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behavioural Brain Research*, 204(2), 313-21. doi: 10.1016/j.bbr.2008.12.016
- Schneider C. A., Rasband W. S. & Eliceiri K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>

TABLES**Table 1.** Brain weight (in grams) in the three groups.

	Treated	Untreated	Control
n	8	8	8
Minimum	0.1650	0.2300	0.1210
Median	0.1915	0.2470	0.1730
Maximum	0.2470	0.2740	0.1900
Mean	0.1986	0.2479	0.1680
Standard deviation	0.02667	0.01376	0.02102

Table 2. Analytical assessment of brain weight (in grams)

Dunn's multiple comparison test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P-value
Untreated vs. Treated	8.063	No	NS	0.0677
Control vs. Treated	-6.375	No	NS	0.2139
Control vs. Untreated	-14.44	Yes	---	0.0001

NS, non-significant.

Table 3. Brain cell counts in the three groups.

	Control	Untreated	Treated
n	8	8	8
Minimum	1148.0	765.0	1094.0
25th percentile	1210	859.3	1299
Median	1299	901.5	1599
75th percentile	1541	1077	1753
Maximum	1757	1101	1856
Mean	1374	942.6	1532
Standard deviation	205.9	121.7	271.9
Standard error of the mean	72.81	43.02	96.14

Table 4. Analytical assessment of brain cell counts.

Dunn's multiple comparison test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P-value
Untreated vs. Control	-10.50	Yes	---	0.0089
Treated vs. Control	2.625	No	NS	>0.9999
Treated vs. Untreated	13.13	Yes	---	0.0006

NS, non-significant.

Table 5. Brain cell size (2×10^3 pixels) in the three groups.

	Control	Untreated	Treated
n	8	8	8
Minimum	276.0	398.0	274.0
25th percentile	291.0	409.8	295.8
Median	306.5	471.5	313.0
75th percentile	347.8	547.3	331.0
Maximum	365.0	561.0	334.0
Mean	314.9	477.0	311.1
Standard deviation	32.19	63.98	21.00
Standard error of the mean	11.38	22.62	7.424

Table 6. Analytical assessment of cell size (2×10^3 pixels).

Dunn's multiple comparison test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P-value
Untreated vs. Control	12.13	Yes	---	0.0018
Treated vs. Control	0.2500	No	NS	>0.9999
Treated vs. Untreated	-11.88	Yes	---	0.0023

NS, non-significant.

Table 7. Analytical assessment of total brain area (2×10^3 pixels).

Dunn's multiple comparison test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P-value
Treated vs. Control	4.250	No	NS	0.6877
Untreated vs. Control	0.8125	No	NS	>0.9999
Untreated vs. Treated	-3.438	No	NS	0.9924

NS, non-significant.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Distribution of brain weight.

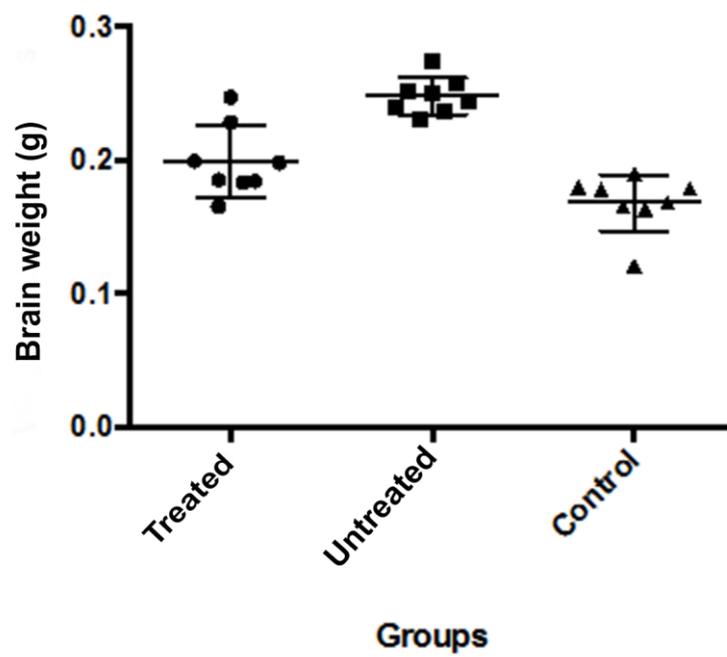


Figure 2. Distribution of cell counts.

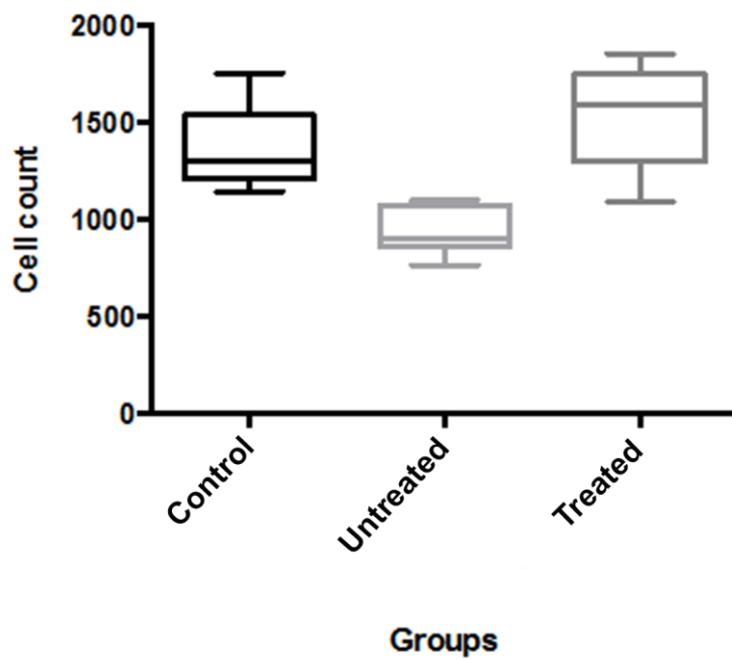


Figure 3. Distribution of cell size.

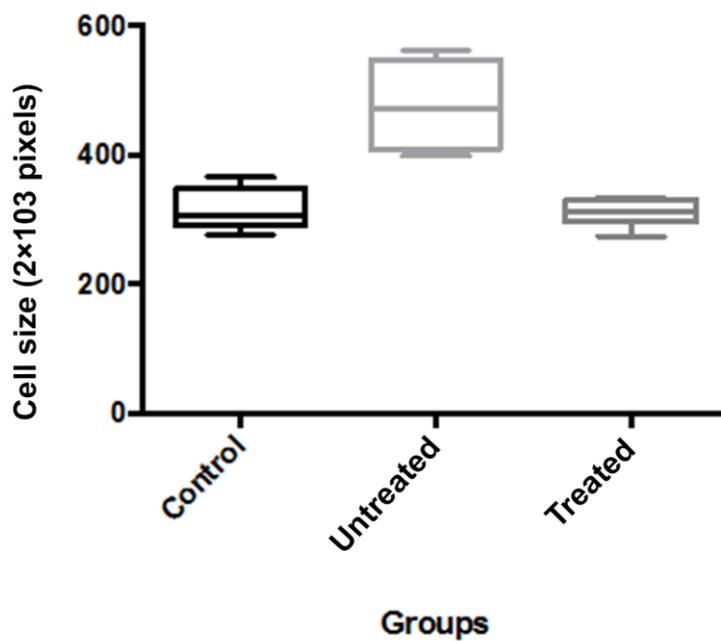
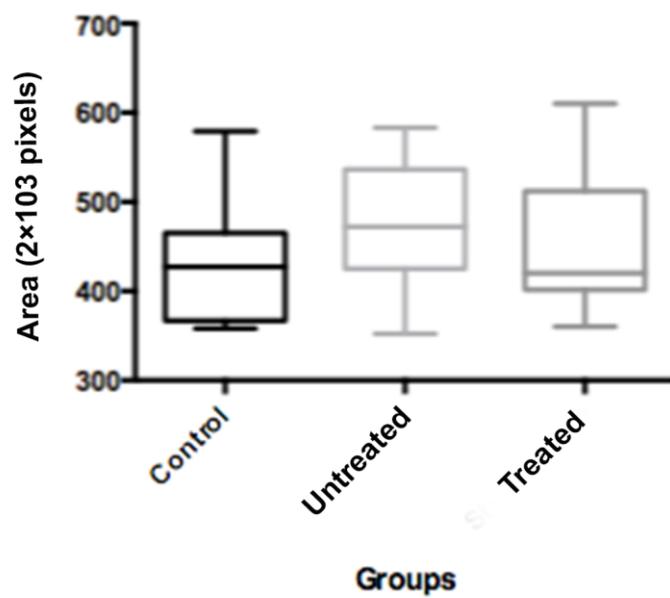


Figure 4. Distribution of total brain area.



Anexos

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

CESED Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento

Facisa
FCM

CEUA
Comitê de Ética em Uso de Animais

PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 4902042015
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 02/04/2015

1. Pesquisador Responsável: Carlos Teixeira Brandt
Título do Projeto: ACHADOS MORFOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM RECÉM-NASCIDOS DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À PERITONITE FECAL AUTÓGENA

2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de 02 / 04 / 2015.

Vigência do Projeto	Abril de 2015 à Junho de 2015
Espécie / linhagem	Novérgicos / Ratos Wistar
Nº de animais	4 animais e suas proles
Peso / idade	250g / 90 dias
Sexo	Masculino e feminino
Origem	Biotério FCM

3. Parecer Final: **APROVADO**

Thárcia Klara B. de Oliveira
Thárcia Klara B. de Oliveira
 Coordenadora do CEUA-CESED

ANEXO B – ARTIGO 02 – PUBLICADO

9 – ORIGINAL ARTICLE
EXPERIMENTAL SURGICAL INFECTIONS**Brain damage and congenital cataract due to autogenously fecal peritonitis
in pregnant Wistar rats¹**

Carlos Teixeira Brandt^I, Maria Cecília Santos Cavalcanti Melo^{II}, Diego Nery Benevides Gadelha^{III}, Neylane Nyeria Coelho Batista Gadelha^{IV}, Thárcia Kiara Beserra Oliveira^V, Maria Priscila Mendes Muniz Falcão^{VI}

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-8650201400160009>

^IPhD, Head, Scientific Methodology and Pediatric Surgery, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE. Scientific director of FCM, Campina Grande-PB, Brazil. Interpretation of data, English language, critical revision.

^{II}Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE. Assistant Professor, Department of Ophthalmology, Campina Grande Faculty of Medicine (FCM), Campina Grande-PB, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^{III}PhD, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Recife-PE. Associate Professor, Department of Ophthalmology, FCM, Campina Grande-PB, Brazil. Manuscript writing, critical revision.

^{IV}Fellow MSc degree, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Recife-PE. Assistant Professor, Department of Ophthalmology, FCM, Campina Grande-PB, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^VFellow Master degree, Agricultural Engineering, Federal Campina Grande University (UFCG)-PB, Campina Grande-PB, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^{VI}Graduate student, FCM, Campina Grande-PB, Brazil. League of experimental surgery, acquisition of data.

ABSTRACT

PURPOSE: To investigate the morphological aspects of brain and eyes in newborn rats whose mother underwent autogenously fecal peritonitis.

METHODS: Four pregnant rats that underwent fecal peritonitis, with a 10% fecal suspension in dose of 4 ml per kilogram received two antimicrobial treatments: 1. intraperitoneal moxifloxacin and dexamethazone; and 2. Intravenous meropenem. After head inspection, the brain consistencies and the eyes belonging to all offspring were analyzed.

RESULTS: The brains of newborn from rats that received 4 ml/kg of 10% suspension of feces showed, significantly smaller and less than the firm consistency of those in the control group. Congenital cataract was observed in 9 (34.6%). No cataract was observed in the 20 newborn rats from the mothers that received the combination of moxifloxacin and dexamethasone. Cataract could be observed in three (13.6%) offspring from mothers that received meropenem.

CONCLUSIONS: Peritonitis can produce brain damage and congenital cataract in rats. The translation to humans is that intra abdominal infection in pregnant women may be associated with damage in brain and eye structures of their concepts. This can be averting using the adequate early therapeutically approach.

Key words: Peritonitis. Quinolones. Carbapenems. Cataract. Rats.

Brandt CT *et al.*

Introduction

The most important treatable cause of childhood remains untreated or poorly treated cataract, which is responsible for 5–20% of all cases, although corneal scarring can present similar or even higher prevalence in some countries¹⁻³. It can be diagnosed at birth or shortly thereafter, or even it develops during the first two years of life⁴⁻⁶.

Among the causes of human congenital cataract are intrauterine infections (toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes, varicella and syphilis). Worldwide, it is estimated that more than 100 000 infants are born with congenital rubella syndrome (CRS) each year, and the burden in developing countries is very high. Congenital cataract is one of the main causes of blindness. However, the majority of cataracts in newborns are genetically caused⁹⁻¹¹. The mutations in structurally and functionally important genes such as EPHA2 in the lens may contribute to a significant proportion of the congenital cataract burden¹². There have been other suggestions of a possible association between pregnancy events and congenital cataracts, including: very low birth weight; maternal substance abuse; urinary tract infection; and aspirin ingestion¹².

As regard to experimental model of this disease, it is well recognized that congenital cataract is present in over 45% of the offspring of diabetic rats¹³. Pregnant rats with hypercholesterolemia can also have pups with congenital cataract¹⁴. Additionally, excessive maternal caffeine exposure during pregnancy can be cataractogenic for neonatal crystalline lenses in these animals¹⁵.

Several mouse models of congenital cataract have genetic basis as exemplified by the following: (i) the most frequent mutations in congenital cataracts affect genes coding for γ -crystallins (gene symbol: Cryg); (ii) some postnatal, progressive cataracts have been characterized by mutations in the β -crystallin encoding genes (Cryb); (iii) mutations in genes coding for membrane proteins like MIP or connexins lead to congenital cataracts; (iv) mutations in genes coding for transcription factors such as FoxE3, Maf, Sox1, and Six5 cause cataracts; (v) mouse models suffering from hereditary age-related cataracts have not yet been characterized genetically¹⁶. It has also been described a mouse mutant Aca47 that carries a missense mutation in the Lim2 gene (c.T151C; p.C51R) that leads to decreased sizes of eye axis and lens. Since homozygous mutants further develop congenital lens opacities, Aca47 might be used as a model for congenital cataract formation in humans¹⁷.

Gram-negative urinary tract infections can complicate human pregnancies. However, the effects of maternal endotoxemia from these microorganisms have rarely been evaluated by animal experiments or by human investigations. The main

affected area from this aggression is the central nervous system¹⁸. Neuroinflammation can sensitize the brain to injurious insults in the embryonic development and produces several anomalies in this system, however not specifically in the eye embryology this injury has been described¹⁹. On the other hand, autoimmune optic neuritis is a common early manifestation of multiple sclerosis, yet early therapeutic interventions for this disease often have high ocular toxicity associated with increased risks for glaucoma, cataract, or retinopathy. This phenomenon can be studied in rat model²⁰.

To the best of our knowledge there is no experimental rat model associating bacterial peritonitis and congenital cataract. Thus, the purpose of this study is to report the occurrence of this congenital anomaly in newborn rats from mothers that underwent autogenously fecal peritonitis early in pregnancy; and also to show two antimicrobial treatments for sepsis and their effects in the prevention of this condition.

Methods

This was a prospective and interventional study and all experiments were conducted in accordance with the national laws for the use of animals in research and approved by the local Ethical Committee at Medical School from Campina Grande – Paraíba, Brazil.

The study design was threefold: 1st: To develop a model of autogenously fecal peritonitis in pregnant rats in a way to produce significant brain damage in the offspring. With this aim it was injected into the abdominal cavity 3ml/kg and 4ml/kg of autogenously filtered 10% fecal suspensions in two groups of 10 animals each at the 9th day of proved pregnancy. After pup birth the female adult rats underwent abdominal and thorax inventory for assessing the findings associate with the peritonitis. The weights of the offspring and their brain were recorded. The morphological aspects of the newborn animals were also described, with special attention to the head structures and the central neural system. Ten animals without any intervention were used as a control group.

2nd: After concluding that the most damaging model for the central nervous system was the injection into the peritoneal cavity of 4ml/kg of filtered 10% fecal suspension at the 9th day of proved pregnancy, two rats with autogenously peritonitis were treated with the combination of moxifloxacin and dexamethasone at the single intra-peritoneal doses of 40mg/kg and 0.2mg/kg, respectively. Both drugs were given at 48 h and 72 h after peritonitis induction.

3rd: Using the same model two pregnant rats as the above mentioned protocol received a single doses of meropenem 60 mg/kg/d i.v at 48 h and 72 h after peritonitis induction.

Brain damage and congenital cataract due to autogenously fecal peritonitis in pregnant Wistar rats

Since after birth the offspring were separated from their mothers and inspected for any congenital malformation and weighed in a precise scale. They were euthanized by halothane and decapitated. After close morphological inspection, the brains were carefully removed and equally weighed.

The quantitative parameters were expressed by their mean and standard deviation. As the parameters did not pass the normality test, the following statistical analyses were used: the Mann-Witney test for unpaired mean differences, the Kruskal-Wallis test and the post-test of Dunn for multi comparisons among means. $p \leq 0.05$ was used for rejecting the null hypothesis.

Results

After delivery the two groups of rats were euthanized and the abdomen and thorax were widely open for inspection, and

pictures were taken for recording the lesions. The multiple infected lesions, inside both cavities, were more frequent and evident in their aggressiveness appearance into the pregnant rats that received 4ml/kg of autogenously filtered 10% fecal suspensions when compared with those that received 3ml/kg (Figures 1-4).



FIGURE 1 -Residual retroperitoneal abscess in the left lateral abdominal wall close by the left kidney could be observed. The pregnant rat had received 4ml/kg of autogenously filtered 10% fecal suspension.

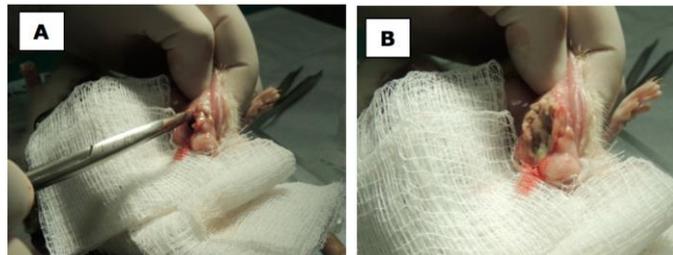


FIGURE 2 – A. Residual abscess opened showing a yellowish mass with no odor. Microbiological study revealed no bacteria. B. Closer view of the same abscess.

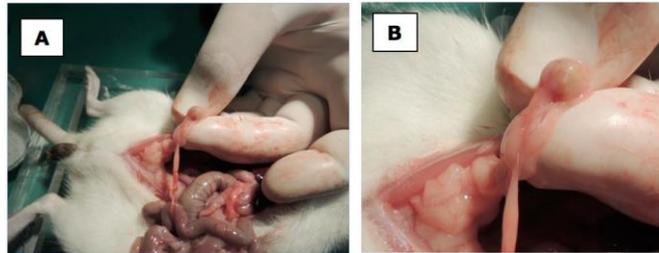


FIGURE 3 – A. Residual abscess close by the uterus could be observed. The pregnant rat had received 4ml/kg of autogenously filtered 10% fecal suspension. B. Closer view of the same abscess.



FIGURE 4 - Residual abscesses or scars within the left lung. The pregnant rat had received 4ml/kg of autogenously filtered 10% fecal suspension.

Brandt CT *et al.*

The mean weight of newborn rats from the animals that received 4 ml/kg of 10% autogenously fecal suspension was significantly smaller than those from animals that received 3 ml/kg of 10% autogenously fecal suspension: {(4 ml/ Kg) - X_2 5.56 g \pm 0.5g versus X_1 (3ml/ Kg): 5.80 g \pm 0.97g - p = 0.0194}; however, the mean weight of the encephalic organs showed no significantly statistical difference: {(4 ml/ Kg) - X_2 1.18g \pm 0,29g versus X_1 (3ml/ Kg) -1.19 g \pm 0,03g - p = 0.3770}; but either means were

significantly smaller than the mean weight of the control ones ($X_{control}$ 1.21g \pm 0.08g - p=0.0004).

The most striking observations in the newborn rats from mothers that received 4ml/kg (10% fecal suspension) were in encephalic and eye organs. The brains from these offspring were jelly like organs that could not maintain intact the morphology (shape) and in 9 (34.6%) from 26 puppies congenital cataracts could be observed; seven had bilateral and two unilateral (Figures 5-14).

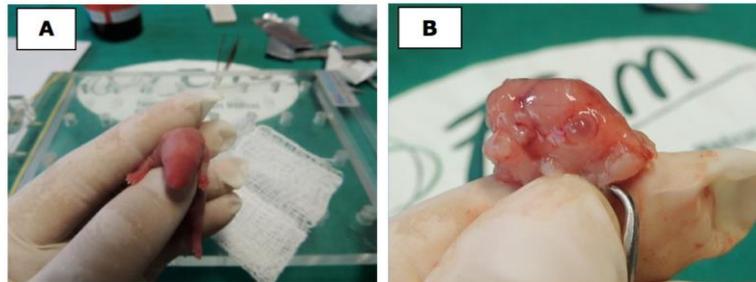


FIGURE 5 – A. Normal offspring from control group. Thin membrane (blepharophimosis) over the normal eyes can be observed. B. After removal of the blepharophimosis and the skin of the skull, the lenses are transparent



FIGURE 6 - Skin removed from skull of an offspring from a mother that received 4ml/kg of fecal suspension. Newborn with bilateral congenital cataract.



FIGURE 7 - Offspring from a mother that received 4ml/kg of fecal suspension with congenital cataract. Close view of the eyes with lenses opacification.

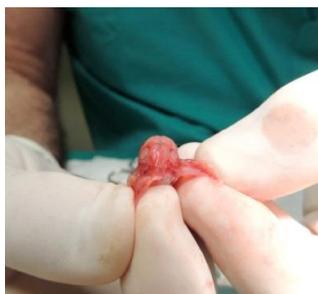


FIGURE 8 - Offspring from a mother that received 4ml/kg of fecal suspension with congenital cataract. Both eyes with lens opacification.



FIGURE 9 - Offspring from a mother that received 4ml/kg of fecal suspension with congenital cataract. Both eyes with lens opacification. Closer view.

Brain damage and congenital cataract due to autogenously fecal peritonitis in pregnant Wistar rats

FIGURE 10 - Offspring from a mother that received 4ml/kg of fecal suspension with congenital cataract. Close view of the left eye with lens opacification.

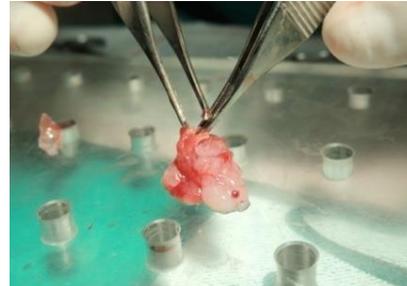


FIGURE 13 - Like brain from an offspring from a rat that received 4 ml/kg of 10% fecal suspension inside the abdomen. View during careful dissection.

The normal offspring rat encephalic area measured at an average of 1.2 cm for the largest extension (from head to tail direction). The normal consistency was parenchyma one (Figures 11 and 12).



FIGURE 11 - Offspring from a normal control mother. Normal brain.

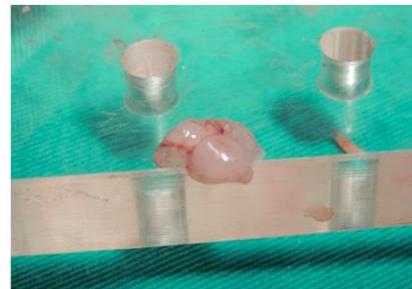


FIGURE 14 - Jelly like brain from an offspring from a rat that received 4 ml/kg of 10% fecal suspension inside the abdomen. Isolated brain, after dissection.



FIGURE 12 - Offspring from a normal control mother. Normal brain.

The brains from the offspring of rats that received 4/ml/kg of 10% autogenously fecal suspension were jelly like consistency (brain melting) and could not be maintained in their normal position or appearance (Figures 13 and 14).

The brains from the newborn rats, which mothers had received the combination of moxifloxacin and dexamethasone at the single intraperitoneally doses of 40 mg/kg and 0.2 mg/kg, respectively were morphologically normal, the brains were also of gross normal morphology and consistency, and no single cataract was observed in all 20 offspring.

The brain morphology of the newborn rats, which mother have received intravenous meropenem were close to normal as regard to the consistency and shape; however in three (13.6%) out of 22 of these offspring, opacification of the normally transparent crystalline lens (cataract) could be observed; two were bilateral and one unilateral.

Discussion

There is no doubt that the enforcement of the VISION 2020 principles may eliminate congenital cataract as the main cause of childhood blindness¹, however the lack of resources in the developing countries may impair the fundamental human right of child, which is to have the right to sight. Taking into account that rubella is one of viral infection that frequently can

Brandt CT *et al.*

produce cataract in newborns in which the pregnant mothers had this infection early in the organogenesis phase, and less-than-optimal postoperative visual outcome for surgical treatment of this condition frequently occurs, one can suggest the need to look at primary prevention of rubella, especially in developing countries. Thus, rubella prevention is an urgent task in order to improve maternal and child health avoiding the rubella syndrome that includes congenital cataract. Thus, avert this disease based on genetics alteration^{7,8}. To achieve this important goal is necessary that a high coverage immunization for this viral infection should be implemented before childbearing age.

As regard to offspring from experimental diabetic rats, the treatment with *Morus alba* extract can be ameliorated effect of mulberry leaves on retinal neurotransmitters, retinal neuronal cells and anti-cataract activity, attributed to its flavonoids content, which shows potential anti-oxidative activity and has potential hypoglycaemic and anti-hypercholesterolemic effects¹⁴.

The literature regarding bacterial infection in pregnant human beings as a source of brain damage is scarce and no reference was found linking peritonitis and congenital cataract.

Maternal endotoxemia, in rat late gestation, seems not to induce fetal rat endotoxemia from maternal endotoxemia, and consequently could not affect the central nervous system. Although neuronal necrosis can be identified in offspring from rats at appropriate gestational ages with *E. coli* endotoxin¹⁸, the effect of the same insult early in the organogenesis phase has not yet been studied. Thus, the present investigation is original and provides a newborn rat model for brain damage and congenital cataract from severe infected mothers.

It is relevant to stress the difference of the amount of enterobacteria and consequently the endotoxemia injected into the abdominal cavity of pregnant rats regarding the effect on newborn brain and eye. Using 3ml/kg of 10% filtered fecal suspension no important features were observed inside the abdomen of rats after delivery and almost no gross damage was observed in the brain and eyes of the offspring. Thus, it was chosen to produce severe abdominal infection in pregnant rats with the dosage of 4ml/kg of 10% filtered fecal suspension for obtaining a reproducible model for severe brain damage and congenital cataract in the newborns.

As comparing the two therapeutically interventions it was observed that the use of moxifloxacin and dexamethasone at the single intra-peritoneal doses of 40mg/kg and 0.2mg/kg, respectively was more effective in protecting the brain and eye damage of the offspring from rats with severe peritonitis. Since the approach of using antibiotics via intra peritoneal cavity is not frequently done for peritonitis, in general, in pregnant

woman with severe abdominal infection the use of moxifloxacin and dexamethasone could provide a new alternative treatment, since in rats with severe intra-abdominal infection it proved to be very effective²¹.

Conclusions

The newborns of rats whose mothers underwent autogenously fecal peritonitis, with a dose of 4 ml/kg showed: brains consistency more liquefied than the control group; and the development of congenital cataract. These findings allow translation to humans, in the sense that intra abdominal infection in pregnant women may be associated with changes in brain and eye structures of their concepts. This can be averting using the adequate early therapeutically approach.

References

1. Foster A, Gilbert C, Johnson G. Changing patterns in global blindness: 1988-2008. *Community Eye Health*. 2008 Sep;21(67):37-9. PMID: 19030126.
2. Ono K, Hiratsuka Y, Murakami A. Global inequality in eye health: country-level analysis from the Global Burden of Disease Study. *Am J Public Health*. 2010 Sep;100(9):1784-8. doi: 10.2105/AJPH.2009.187930.
3. Churchill A, Graw J. Clinical and experimental advances in congenital and paediatrics cataracts. *Phil Trans R Soc*. 2011 Apr;366:1234-49. doi: 10.1098/rstb.2010.0227.
4. Yorston D, Wood M, Foster A. Results of cataract surgery in young children in east Africa. *Br J Ophthalmol*. 2001 Mar;85:267-71. doi: 10.1136/bjo.85.3.267.
5. Mwende J, Bronsard A, Mosha M, Bowman R, Geneau R, Courtright P. Delay in presentation to hospital for surgery for congenital and developmental cataract in Tanzania. *Br J Ophthalmol*. 2005 Nov;89(11):1478-82. doi: 10.1136/bjo.2005.074146.
6. Randrianotahina HC, Nkumbe HE. Pediatric cataract surgery in Madagascar. *Niger J Clin Pract*. 2014 Jan-Feb;17(1):14-7. doi: 10.4103/1119-3077.122824.
7. Robertson SE, Featherstone DA, Gacic-Dobo M, Hersh BS. Rubella and congenital rubella syndrome: global update. *Rev Panam Salud Publica*. 2003 Nov;14:306-15. doi.org/10.1590/S1020-49892003001000005.
8. Dewan P, Gupta P. Burden of Congenital Rubella Syndrome (CRS) in India: a systematic review. *Indian Pediatr*. 2012 May;49(5):377-99. doi: 10.1007/s13312-012-0087-4.
9. Shiels A, Bennett TM, Knopf HL, Maraini G, Li A. The EPHA2 gene is associated with cataracts linked to chromosome 1p. *Mol Vis*. 2008 Nov;14:2042-55. PMID: PMC2582197.
10. Zhang T, Hua R, Xiao W, Burdon KP, Bhattacharya SS. Mutations of the EPHA2 receptor tyrosine kinase gene cause autosomal dominant congenital cataract. *Hum Mutat*. 2009 Mar;30:E603-11. doi: 10.1002/humu.20995.
11. Dave A, Laurie K, Staffieri SE, Taranath D, Mackey DA, Mitchell P, Wang JJ, Craig JE, Burdon KP, Sharma S. Mutations in the EPHA2 gene are a major contributor to inherited cataracts in South-Eastern Australia. *PLoS One*. 2013 Aug;8(8):e72518. doi: 10.1371/journal.pone.0072518.

Brain damage and congenital cataract due to autogenously fecal peritonitis in pregnant Wistar rats

12. Prakalapakorn SG, Rasmussen SA, Lambert SR, Honein MA. National Birth Defects Prevention Study. Assessment of risk factors for infantile cataracts using a case-control study: National Birth Defects Prevention Study, 2000-2004. *Ophthalmology*. 2010 Aug;117(8):1500-5. doi: 10.1016/j.ophtha.2009.12.026.
13. Simán CM, Naeser P, Eriksson UJ. Increased lenticular aldose reductase activity and high incidence of congenital cataract in the offspring of diabetic rats. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1993 May;71(5):629-36. doi: 10.1111/j.1755-3768.1993.tb04652.x
14. El-Sayyad HI, El-Sherbiny MA, Sobh MA, Abou-El-Naga AM, Ibrahim MA, Mousa SA. Protective effects of *Morus alba* leaves extract on ocular functions of pups from diabetic and hypercholesterolemic mother rats. *Int J Biol Sci*. 2011 Jun;7(6):715-28. PMID: PMC3119844.
15. Evereklioglu C, Güldar E, Alasehirli B, Cengiz B, Sari I, Pirbudak L. Excessive maternal caffeine exposure during pregnancy is cataractogenic for neonatal crystalline lenses in rats: a biomicroscopic and histopathologic study. *Acta Ophthalmol Scand*. 2004 Sep;82(5):552-6. doi: 10.1111/j.1600-0420.2004.00331.x.
16. Graw J. Mouse models of cataract. *J Genet*. 2009 Dec;88(4):469-86. doi: org/10.1007/s12041-010-0004-3.
17. Puk O, Ahmad N, Wagner S, de Angelis MH, Graw J. Microphakia and congenital cataract formation in a novel *Lim2(C51R)* mutant mouse. *Mol Vis*. 2011 May;17:1164-71. PMID: PMC3102026.
18. Ornoy A, Altshuler G. Maternal endotoxemia, fetal anomalies, and central nervous system damage: a rat model of a human problem. *Am J Obstet Gynecol*. 1976;124(2):196-204. PMID: 1108657.
19. Malaeb S, Dammann O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *J Child Neurol*. 2009 Sep;24(9):1119-26. doi: 10.1177/0883073809338066.
20. Stokely ME, Bhat MA, Koulen P. Microfluorimetry defines early axonal damage in a rat model of optic neuritis: a novel method targeting early CNS autoimmunity. *J Neurosci Methods*. 2007 Nov;166(2):217-28. doi: org/10.1016/j.jneumeth.2007.07.010.
21. Melo MC, Gadelha DN, Oliveira TK, Brandt CT. Severe autogenously fecal peritonitis in Wistar rats with permanent bilateral carotid occlusion. Response to intra peritoneal moxifloxacin combined with dexamethasone. *Acta Cir Bras*. 2014 Feb;29(2):76-81. doi: org/10.1590/S0102-86502014000200001.

Correspondence:

Carlos Teixeira Brandt
Avenida Boa Viagem, 5030/1302
51011-000 Recife – PE Brasil
Tel.: (55 81)3342-0830
carlosbrandt@bol.com.br

Received: May 19, 2014

Review: July 18, 2014

Accepted: Aug 22, 2014

Conflict of interest: none

Financial source: Medical Sciences, Faculty of Campina Grande

¹Research performed at Experimental Research Unit, Campina Grande Medical School (FCM), Campina Grande-PB, Brazil. Part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Surgery, Federal University of Pernambuco (UFPE). Tutor: Prof. Carlos Teixeira Brandt.

ANEXO C – ARTIGO 03 – PUBLICAÇÃO COMPLEMENTAR



Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável

<http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS>

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DOI: <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v10i5.3455>



Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular

Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira) and their properties in the People's Medicine

Maria Priscila Mendes Muniz Falcão¹, *Tharcia Kiara Beserra de Oliveira², Diêgo de Albuquerque Sarmiento¹, Nathallya Pessoa Rodrigues do Ó¹, Neylane Coelho Gadelha³.

RESUMO: A *Schinus terebinthifolius* Raddi popularmente conhecida como "aroeira" é amplamente utilizada na medicina popular, sendo seu uso relacionado, por exemplo, aos variados polifenóis distribuídos desigualmente em suas estruturas, como folhas, cascas, frutos, flores e sementes. Esta planta atua no tratamento de afecções como diarreias, gastrites e dispepsias; tem ação adstringente, tônico, estimulante e anti-neurálgico. Utilizada por via oral ou tópica para cura de várias doenças, com efeitos diversos, incluindo ações antimicrobianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes. Experimentos realizados com a espécie em questão são facilitados, pois além de apresentar um uso amplo na medicina popular brasileira, ela possui fácil extração, secagem, moagem, preparo, conservação e aplicação. A *S. terebinthifolius* Raddi apresenta-se como uma opção de baixo custo, acessível, todavia sua manipulação se faz muitas vezes sem embasamento científico. Este artigo faz um levantamento amplo dessa planta mostrando seus efeitos benéficos relacionados à medicina popular.

Palavras-chave: Conhecimento popular; Medicina comunitária; Vegetal; Fitoterápico

ABSTRACT: The *Schinus terebinthifolius* Raddi popularly known as "Aroeira" is widely used in folk medicine, being your use related, for example, the various polyphenols unevenly distributed in their structures, such as leaves, bark, fruits, flowers and seeds. This plant operates in the treatment of diseases such as diarrhea, gastritis and dyspepsia; action is astringent, tonic, stimulant and anti-neuralgic. Used orally or topically for curing various diseases, including various effects including anti-microbial, anti-inflammatory and healing actions. Experiments with the species in question are facilitated, as well as presenting a wide use in Brazilian folk medicine, it has easy extraction, drying, grinding, preparation, storage and application. The *S. terebinthifolius* Raddi presents itself as a low cost option available, but its handling is done often without scientific basis. This article makes a comprehensive study of this plant showing its beneficial effects related to folk medicine.

Key words: Popular knowledge; Community medicine; Vegetable; Phytotherapy

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 16/06/2015; aprovado em 24/11/2015

¹Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande – FCM-CG; Campina Grande, PB – Brasil.

²Doutoranda no Programa de Pós – Graduação de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG; Campina Grande, PB – Brasil e-mail: tharcia_kiara@hotmail.com

³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, Recife-PE. Professor Assistente do Departamento de Oftalmologia, FCM, Campina Grande-PB, Brasil.

Maria Priscila Mendes Muniz Falcão et al.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento é tratada com base na medicina popular, sendo desse total 85% representado pelo uso de produtos de origem vegetal (NETO et al., 2006). O aumento do interesse da comunidade científica em estudar a fitoterapia – ciência que objetiva a cura utilizando plantas medicinais - levou ao desenvolvimento de várias pesquisas baseadas nas práticas e conhecimentos populares (LUCENA et al., 2006).

A Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é utilizada como planta de propriedades medicinais há muitos anos, sendo seu uso referido desde as primeiras edições da Farmacopéia Brasileira (1926). É oriunda do Peru, com ampla distribuição geográfica nas regiões brasileiras, assim como em localidades da África e da Oceania (LUCENA, et al., 2006; CARVALHO et al., 2013). No Brasil, essa planta é recomendada pelo Sistema Único de Saúde e aprovada como droga feita à base de ervas pela Agência Nacional de Vigilância à Saúde, compondo alguns medicamentos de uso comercial, como géis para tratamento ginecológico (BULLA et al., 2015).

Suas ações terapêuticas podem ser atribuídas aos variados polifenóis que estão distribuídos desigualmente em seus órgãos, como folhas, cascas, frutos, flores e sementes. Isso justifica o uso medicinal popular desta planta como, por exemplo, antiinflamatória, cicatrizante e antimicrobiana (possui ação contra algumas bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus albus* e *Candida albicans*) (CARVALHO et al., 2013).

Este trabalho consta de uma revisão de literatura com o objetivo de listar os principais usos da Aroeira na medicina popular, mediante seu fácil acesso pela população brasileira e vasto emprego como fitoterápico.

METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa exploratória e descritiva, e, quanto aos procedimentos de coleta de dados, bibliográfica. Foi realizada uma revisão de literatura, onde foram utilizados materiais como Internet (pubMed, Scielo), referentes ao assunto, destacando aspectos regionais e temáticos. Pesquisa documental traz como vantagem a análise de documentos que se constitui em uma fonte rica e estável de dados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Características gerais da Aroeira

A Aroeira é uma árvore de variado porte, possui casca escamosa e fina. Suas folhas contêm folíolos lanceolados e pontiagudos, a planta ainda possui pequenas flores, dispostas em pedúnculos de tonalidade brancas ou amarelas esverdeadas. O fruto é drupa vermelha com aroma semelhante ao da pimenta. A disseminação ocorre através das sementes e, provavelmente, por estaquia a partir de segmentos da raiz e do caule. O crescimento é relativamente rápido, podendo atingir 1,0 m de altura no primeiro ano (CARMELLO-GUERREIRO; SARTORI, 1999; OLIVEIRA JUNIOR, 2013).

Pertence à família Anacardiaceae, a qual inclui outras 29 espécies e é nativa da América do Sul. No Brasil é encontrada principalmente entre as regiões de Pernambuco ao Rio Grande do Sul (OLIVEIRA e ARAÚJO, 2007; SANTOS, et al., 2006). Embora mais frequente ao longo do litoral brasileiro, ela também pode estar presente no interior do Brasil, como evidenciam os trabalhos históricos em relação ao seu uso na região da Amazônia e de Minas Gerais, entre outras localidades (GILBERT; FAVORETO, 2011; CARVALHO et al., 2013).

Além do nome comumente conhecido, “Aroeira”, ela apresenta várias nomenclaturas populares, de acordo com a região encontrada, podendo ser chamada de “aroeira da praia”, “aroeira negra”, “aroeira vermelha”, “aroeira de Minas”, “corneiba” (Brasil), “chichita” (Argentina); “copal” (Cuba) e “pimenta de Brasil”. (CARVALHO et al., 2013).

Registros históricos da Aroeira

S. terebinthifolius Raddi foi primeiramente citada pelo nome indígena como planta medicinal por Piso, holandês que esteve no nordeste entre 1637 e 1644. Em 1694, João Ferreyra da Rosa também relatou seu emprego em campanha contra a febre amarela. Já no século 19, a planta esteve entre as 39 espécies medicinais citadas por naturalistas que viajaram por Minas Gerais e foram listadas na 1ª Farmacopéia Brasileira em 1926. O médico Alfredo da Matta cita em 1912 o uso do decocto como antitérmico - Chernoviz em 1920 também descreveu como terapêutica para edema dos membros inferiores - e da resina da casca contra enfermidades reumatológicas (GILBERT; FAVORETO, 2011).

Composição química da Aroeira

A Aroeira apresenta uma gama de substâncias em sua composição, como os compostos: Terebinthona, o ácido hidroximasticadienóico, o ácido terebinthifólico e o ácido ursólico (LIPINSKI et al., 2012)

Além destas substâncias, a espécie evidencia, entre outros constituintes, taninos, flavonóides e óleos essenciais. De todos os resultados da metabolização de compostos sintetizados pela planta, fazem parte do grupo de substâncias com maior número de compostos biologicamente ativos, os alcalóides e os óleos essenciais. Estes últimos atuam como inibidores da germinação, na proteção contra perda de água e aumento da temperatura, na proteção contra predadores e na atração de polinizadores (SANTOS et al., 2007).

Os óleos essenciais da *S. terebinthifolius* apresentaram destaque na presença de monoterpenos (85.81%), apresentando como constituição principal: 3-careno (30.37%), limoneno (17.44%), felandreno (12.60%), pineno (12.59%), mirceno (5.82%) e o-cimeno (3.46%); sesquiterpenos mostraram em menor proporção (5.34%). Ainda quanto ao extrato, este contém em sua resina resquícios de óleos voláteis, os quais ainda têm em sua composição o carvacrol (COLE et al, 2014).

Estudo fitoquímico e biológico realizados em *S. terebinthifolius* descreveram a ocorrência de terpenóides e ácidos graxos também em sua constituição. Entre os terpenóides, dois triterpenos separados da Aroeira foram caracterizados como inibidores específicos da fosfolipase A2. Estudos citam ainda que o extrato etanólico possui acetato de

Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular

galato, quercitrina, gaiato de metilo e miricetina responsáveis, possivelmente, pela ação contra radicais livres. Na medicina popular, tem sido utilizada como um tratamento para as infecções respiratórias e distúrbios digestivos, tais como gastrite, atonia gástrica e diarreia (ESTEVAO et al., 2015; CARVALHO et al., 2013).

Usos variados da Aroeira

S. terebinthifolius é empregada para forragem de abelhas e de cabras, como matéria prima para a confecção de cercas e como planta ornamental. (CARMELLO-GUERREIRO; SARTORI, 1999).

A Aroeira ainda é utilizada como base para produtos cosméticos (SOUZA et al., 2014), amplamente na culinária européia (CARVALHO et al., 2015) e na restauração de habitats (NICKERSON; FLORY 2015).

Há relatos que a planta também possui efeito tripanocida (SARTORELLI et al., 2012), larvicida contra *A. Aegypti* (PROCÓPIO et al 2015) e inseticida (KWEKA et al., 2011).

Ainda há uma possível ação antidepressiva (PICCINELLI et al., 2015), efeito hepatoprotetor (ABDOU et al., 2015) e fotoprotetor (BULLA et al., 2015).

Em estudos feitos com animais de laboratório na área cirúrgica, a *S. terebinthifolius* possui ação contra a peritonite secundária (MELO et al., 2014), emprego na cicatrização de gastrorrafias (SANTOS et al., 2006) e de lesões operatórias na bexiga (LUCENA et al., 2006).

Usos terapêuticos da Aroeira na medicina popular

A Aroeira é amplamente utilizada na medicina popular, o que está relacionado, por exemplo, aos variados polifenóis distribuídos desigualmente em seus órgãos, como folhas, cascas, frutos, flores e sementes. Essa planta atua no tratamento de afecções como diarreias, gastrites e dispepsias; tem ação como adstringente, tônico, estimulante e anti-neurálgico (CARVALHO et al., 2013).

Devido à composição de seus óleos essenciais, também é usada na terapia de afecções respiratórias (DEGÁSPARI, et al., 2005) a exemplo da bronquite, através de infusões de suas folhas (BARBOSA et al., 2007). A casca da *S. terebinthifolius* Raddi ainda tem ação anti-térmica, atua contra hemoptises e doenças uterinas, em geral. Dessa porção da aroeira ainda se extrai óleo, o qual é empregado contra distúrbios da córnea (DEGÁSPARI et al., 2005).

A aroeira ainda é utilizada no combate à gota e artrite (DEGÁSPARI et al., 2005) - há relatos de que pacientes portadores dessas enfermidades reumatológicas obtiveram grande alívio após tomar banhos quentes com decoção das cascas da Aroeira. A explicação para seu uso na artrite gotosa foi dada por Carvalho et al (2013) - descreve um estudo no qual a planta apresentou uma atividade inibidora contra a xantina oxidase, mecanismo de ação semelhante ao do Alopurinol, droga formalmente usada no tratamento da doença.

Cavalher-Machado et al. (2008) demonstrou a partir de compostos aromáticos isolados da aroeira propriedades anti-alérgicas expressivas, representadas pela impediu da formação de edemas - inibiu o edema de pata nos ratos do estudo na mesma proporção que a Prometazina, droga anti-alérgica; inibição da desgranulação dos mastócitos e do

influxo de eosinófilos como um resultado da diminuição da produção de mediadores eosinofílicos.

Carvalho et al (2013) correlaciona as propriedades anti-inflamatórias da planta mediante a presença do schinol e o ácido masticadienóico caracterizados como inibidores competitivos ativos dirigidos a sítios específicos de fosfolipase A2 - a qual está intrinsecamente relacionada a fisiopatologia das reações inflamatórias.

Segundo Martinez (2000), em sua pesquisa utilizando o extrato etanólico das folhas da *S. terebinthifolius* Raddi, ela apresentou atividade anti-microbiana nas concentrações de 80, 60, 40, 30, 15, 5 y 1 % frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e ao fungo *Candida albicans*. Óleos essenciais da planta ainda atuam contra *Bacillus subtilis*, *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus albus* (SILVA et al., 2010).

Considerando essa ação antimicrobiana, em um estudo feito por Amorim e Santos (2003) que empregou o gel de aroeira em quarenta e oito mulheres com vaginose bacteriana sintomática e depois comparou-se o uso do gel vaginal de aroeira (25 casos) com o placebo (23 casos). A taxa de cura foi de 84% no grupo da aroeira e 47,8% no grupo placebo.

Ribas et al. (2006) demonstraram em seus estudos que a aplicação tópica diária de extratos de *S. terebinthifolius* sobre úlceras orais crônicas acelera a reparação do tecido epitelial e conjuntivo, além de estimular a queratinização, diminuir a intensidade de processos inflamatórios crônicos e melhorar a maturação do colágeno. A ação cicatrizante se deve a presença de taninos em sua composição (MARTORELLI et al., 2011).

CONCLUSÕES

A *S. terebinthifolius* Raddi é largamente utilizada na medicina popular e tem princípios ativos potentes para produção de diversos fármacos. Estudos demonstram seus efeitos benéficos por via oral e tópica. Apesar de muitos estudos avaliarem as propriedades biológicas desta planta, pouco tem sido feito para identificar e caracterizar seus efeitos terapêuticos e toxicológicos em vias de administração invasivos, o que certamente é um nicho que precisa ser mais explorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOU, R. H.; SALEH, S. Y.; KHALIL, W. F. Toxicological and biochemical studies on *Schinus terebinthifolius* concerning its curative and hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced liver injury. *Pharmacognosy Magazine*, v. 11, n. 42, p. 93-101, 2015.
- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.
- BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; PAULA, V. F.; ISMAIL, F. M. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus*

Maria Priscila Mendes Muniz Falcão et al.

- terebinthifolius raddi. Química Nova [online], São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.
- BULLA, M. K.; HERNANDES L.; BAESSO, M. L.; NOGUEIRA, A. C.; BENTO, A. C.; BORTOLUZZI, B. B.; SERRA L. Z.; CORTEZ D. A. Evaluation of Photoprotective Potential and Percutaneous Penetration by Photoacoustic Spectroscopy of the Schinus terebinthifolius Raddi Extract. Photochemistry and Photobiology, v. 91, n. 3, p. 558-566, 2015.
- CAVALHER-MACHADO, S. C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. A.; HERINGE, A. P.; DE OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. D. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. International Immunopharmacology, v. 8, n. 11, p. 1552-1560, 2008.
- CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: composição química, propriedades biológicas e toxicidade. Revista brasileira de plantas medicinais, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.
- CARVALHO, R. O.; MACHADO, M. B.; LOPES, R. S.; SCHERER, V. S.; CRUZ, W. A.; LUZ, M. L. G. S.; LUZ, CARLOS A. S.; GADOTTI, G. I.; GOMES, M. C. Agroindustry for drying pink pepper (*Schinus terebinthifolius*). Agricultural Engineering International: CIGR Journal, v. 12, n. 1, p.177-180, 2015.
- CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; SARTORI, P. A. Morfologia e anatomia da semente de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Desenvolvimento. Revista brasileira de botânica. [online], São Paulo, v. 22, n. 1, p. 91-98, 1999.
- COLE, E. R.; SANTOS, R. B.; JÚNIOR, V. L.; MARTINS, J. D. L.; GRECO, S. J.; CUNHA NETO, A. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 821-828, 2014.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKY, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Ciência e agrotecnologia, Lavras, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.
- ESTEVÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SIMÕES, R. S.; ARANTES, R. M. E.; RACHID, M. A.; SILVA, R. M. G.; MENDONÇA, F. S.; NETO, J. E. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Acta Cirúrgica Brasileira, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 289-295, 2015.
- GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi, Revista Fitos, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p. 43-56, 2011.
- KWEKA, E. J.; NYINDO, M.; MOSHA, F.; SILVA, A. G. Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. Parasites & Vectors, v. 4, n. 129, p. 1-10, 2011.
- LIPINSKI, L. C.; WOUK, A. F.; DA SILVA, N. L.; PEROTTO, D.; OLLHOFF, R. D. Effects of 3 Topical Plant Extracts on Wound Healing in Beef Cattle. Africal Journal of Traditional, Complementary and Alternative. v. 9, n. 4, p. 542-547, 2012.
- LUCENA, P. L. H.; FILHO, J. M. R.; MAZZA, M.; CRECZKO, G.; DIETZ, U. A.; NETO, M. A. C.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; THIELE, E. SAvaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 46-51, 2006.
- MARTINEZ G. M. J.; LOPEZ B. M.; MOREJON R. Z.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de unextracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius* raddi (copal). Revista Cubana de Plantas Mediciniais [online]. v. 5, n. 1, p. 23-25, 2000.
- MARTORELLI, S. B. F.; PINHEIRO, A. L. B.; HIGINO, J. S.; BRAVO, F. Efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (AROEIRA) a 30% em orabase – estudo “In vivo”. International Journal of Dentistry. v. 10, n. 2, p. 80-90, 2011.
- MELO, M. C. S. C.; GADELHA, D. N. B.; OLIVEIRA, T. K. B.; BRANDT, C.T. Alcohol extract of *Schinus terebinthifolius* raddi (anacardiaceae) as a local antimicrobial agent in severe autogenously fecal peritonitis in rats. Acta Cirúrgica Brasileira, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 52-56, 2014.
- NETO, M. L. C. B.; FILHO, J. M. R. MALAFAIA, O. FILHO, M. A. O. CZECHKO, N. G; AOKI, S. CUNHA, R. FONSECA, V. R. TEIXEIRA, H. M. AGUIAR, L. R. et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 17-22, 2006.
- NICKERSON, K.; FLORY S. L. Competitive and allelopathic effects of the invasive shrub *Schinus terebinthifolius* (Brazilian peppertree). Biological Invasions, v. 17, n. 2, p. 555-564, 2015
- OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G.; SANTOS, R. B.; REIS, F. O.; MATSUMOTO, S.T.; BISPO, W. M. S.; OLIVEIRA, L. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) gloeosporioides Sobre

Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular

- Colletotrichum. Revista brasileira de plantas medicinais [online]. v. 15, n. 1, p. 150-157, 2013.
- OLIVEIRA, C. J.; ARAUJO, T. L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. Revista Eletrônica de Enfermagem, Goiás, v. 09, n. 1, p. 93-105, 2007.
- PICCINELLI, A. C.; SANTOS, J. A.; KONKIEWITZ, E. C.; OESTERREICH, S. A.; FORMAGIO, A. S.; CRODA, J.; ZIFF, E. B.; KASSUYA, C. A. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. Nutritional neuroscience, v. 18, n. 5, p. 217-224, 2015.
- RIBAS, M. O.; SOUSA, M. H., SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. Revista Odonto Ciência, Porto Alegre, v. 21, n. 53, p. 245-52, 2006.
- SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; DOS SANTOS, P. L.; SERAFINI, L. A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1011-1013, 2007.
- SANTOS, O.; RIBAS FILHO, J. M.; CZECZKO, N. G.; BRANCO NETO, M. L. C.; NAUFEL JÚNIOR, C.; FERREIRA, L. M.; CAMPOS, R. P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R. D.; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 39-45, 2006.
- SARTORELLI, P.; SANTANA, J. S.; GUADAGNIN, R. C.; LAGO, J. H. G.; PINTO, E. G.; TEMPONE, A. G.; STEFANI, H. A.; SOARES, M. G.; DA SILVA, A. M. In vitro trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Química Nova [online], v. 35, n. 4, pp. 743-747, 2012.
- SILVA, A. B. .; SILVA, T.; FRANCO, E.S.; RABELO, S. A.; LIMA, E. R.; MOTA, R. A.; CÂMARA, C. A. G.; PONTES-FILHO, N.T.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi). Brazilian Journal of Microbiology [online], São Paulo, v. 41, n. 1, p. 158-163, 2010.
- SOUZA et al. Characterization of wild genotypes of Aroeira: Subsidy for planta breeding. Academic Journals. V. 6, n. 4, p. 39-49, 2014.